

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LA PETITE RIBONUCLÉOPROTÉINE
NUCLÉOLAIRE SNR30 ET SES PROTÉINES ASSOCIÉES

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
VINCENT LEMAY

JUIN 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

« The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not "Eureka!" but "That's funny ..." »

Isaac Asimov

REMERCIEMENTS

Ce long projet de doctorat n'aurait pu être possible sans l'aide et le support de plusieurs personnes que j'aimerais remercier. D'abord, le plus grand des mercis au Dr. François Dragon, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné la chance de travailler sur un projet aussi intéressant. Ton encadrement, ton encouragement, tes conseils précieux et surtout ta patience m'ont permis d'atteindre mes objectifs tout en me permettant de parfaire mes connaissances en biologie moléculaire. Merci pour cette opportunité qui m'a été des plus enrichissantes. Je voudrais aussi remercier mes collègues de laboratoire ainsi que mes collègues biologistes de nos laboratoires voisins qui m'ont aidé de près ou de loin sur ce projet. Vos conseils et votre support ont été grandement appréciés.

Ensuite, je voudrais remercier les différents chercheurs et étudiants membres du RiboClub de Sherbrooke et du Yeast Club de Montréal pour leurs conseils et leur expertise dans ces différents domaines; les Dr Marlene Oeffinger, Benoît Barbeau et Éric Rassart , membres de mon comité d'évaluation et les différents professeurs, techniciens, chargés de cours et étudiants qui m'ont appuyés, encouragés et conseillés au cours de mes études.

Enfin, un merci particulier à ma marmotte d'amour Mireille, à ma petite cocotte Charlotte, mes parents, les autres membres de ma famille ainsi que mes amis qui m'ont grandement soutenus au cours de ce projet. Sans vos encouragements constants je n'y serais pas arrivé. Merci pour tout!

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xi
RÉSUMÉ.....	xii
 CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 État des connaissances.....	1
1.1.1 Le nucléole	1
1.1.2 Localisation nucléolaire.....	4
1.1.3 Le ribosome.....	4
1.1.4 Les petits ARN nucléolaires (snoRNA).....	8
1.1.5 Les protéines associées aux snoRNA C/D.....	13
1.1.6 Les protéines associées aux snoRNA H/ACA.....	15
1.1.7 Expression des snoRNA.....	17
1.1.8 Maturation des ARNr.....	19
1.1.9 La petite ribonucléoprotéine nucléolaire snR30.....	23
1.1.10 Ribosomopathies.....	28
1.2 Hypothèses.....	31
1.3 Objectifs.....	32
1.4 Méthodologie générale.....	33
 CHAPITRE II	
IDENTIFICATION DE NOUVELLES PROTÉINES ASSOCIÉES AVEC LE PETIT ARN NUCLEOLAIRE DE LEVURE SNR30.....	35
2.1 Avant propos.....	35
2.2 Abstract.....	37
2.3 Introduction.....	38

2.4 Materials and methods.....	41
2.4.1 Generation of the S1-snR30 construct.....	41
2.4.2 Yeast strains and media.....	41
2.4.3 Spot assays and growth curves.....	41
2.4.4 Affinity purification of S1-snR30.....	42
2.4.5 RNA analyses.....	43
2.4.6 Production of anti-Cbf5 and anti-Nop6 antibodies.....	43
2.4.7 Protein analyses.....	44
2.4.8 Validation of mass spectrometry results.....	44
2.4.9 Sucrose density gradients.....	44
2.4.10 Immunofluorescence microscopy.....	45
2.4.11 Chromatin spreads and electron microscopy.....	45
2.5 Results.....	46
2.5.1 Affinity purification of snR30 snoRNP.....	46
2.5.2 Association of TAP-tagged proteins Nop6, Rps9A/B, Rps18A/B, Htb1/2 and Hhf2 with snR30 snoRNA.....	48
2.5.3 Endogenous Nop6 localizes to the nucleolus and cosediments with snR30 snoRNP in sucrose gradients.....	49
2.5.4 The snR30 snoRNA is required for cleavage at site A0, A1 and A2 and absence of Nop6 affects cleavage at site A2.....	51
2.5.5 Absence of snR30 snoRNP impairs mature SSU processome assembly.....	52
2.6 Discussion.....	53
2.7 Funding.....	59
2.8 Acknowledgments.....	59
2.9 Figure legends.....	59
2.10 Figures.....	63
2.11 Supplemental data.....	72
2.12 Supplemental figure legends.....	74

2.13 Supplemental figures.....	75
CHAPITRE III	
DIFFÉRENCES FONCTIONNELS ENTRE LES PROTÉINES RIBOSOMIQUES RPS18A ET RPS18B.....	76
3.1 Avant-propos.....	76
3.2 Abstract.....	78
3.3 Introduction.....	79
3.4 Results.....	81
3.4.1 Deletion of <i>rps18a</i> or <i>rps18b</i> leads to growth defects.....	81
3.4.2 Expression levels of <i>rps18a</i> and <i>rps18b</i> are different.....	83
3.4.3 Expression levels of Rps18A and Rps18B paralogs affect their association with snoRNAs.....	84
3.4.4 Deletion of <i>rps18a</i> or <i>rps18b</i> leads to different pre-rRNA processing defects.....	85
3.4.5 Sequence analyses reveal differences between <i>rps18a</i> and <i>rps18b</i>	86
3.5 Discussion.....	87
3.6 Materials and methods.....	92
3.6.1 Yeast strains.....	92
3.6.2 Spot assays and growth curves.....	92
3.6.3 Sucrose density gradients.....	93
3.6.4 Immunoprecipitations.....	93
3.6.5 RNA and protein analyses	94
3.6.6 Oligonucleotides.....	94
3.7 Acknowledgments.....	95
3.8 Figure legends.....	96
3.9 Figures.....	99
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	103
4.1 La snoRNP snR30.....	104
4.2 SnR30 et les histones.....	105

4.3 La protéine nucléolaire Nop6.....	106
4.4 Les protéines ribosomiques Rps9 et Rps18.....	107
4.5 Conclusions générales.....	111
BIBLIOGRAPHIE.....	112

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Observation de structures nucléolaires de levure et d'étalements de chromatine nucléolaire par microscopie électronique.....	3
1.2	Structure des sous-unités ribosomiques de la levure <i>S. cerevisiae</i>	6
1.3	Structure secondaire des snoRNA.....	9
1.4	Modifications post-transcriptionnelles effectuées par les snoRNP.....	11
1.5	Protéines associées aux snoRNA.....	14
1.6	Expression des snoRNA.....	18
1.7	Maturation du pré-ARNr chez <i>S. cerevisiae</i>	21
1.8	Schéma d'assemblage du SSU processome.....	23
1.9	Schéma de la structure secondaire de snR30.....	25
1.10	Site d'appariement de snR30 dans l'ARNr 18S.....	26
2.1	S1-tagged snR30 is functional <i>in vivo</i>	63
2.2	Selective purification of S1-tagged snR30 snoRNP.....	64
2.3	Purified S1-snR30 contains H/ACA proteins and a number of additional proteins.....	65
2.4	Analysis of snoRNAs that co-immunoprecipitate with TAP-tagged proteins.....	66
2.5	Nop6 localizes to the nucleolus in normal and snR30 snoRNA-depleted cells.....	67
2.6	Sucrose gradient sedimentation analysis.....	68
2.7	Depletion of snR30 snoRNA disrupts Nop6 association with other snoRNAs.....	69
2.8	Primer extension analysis of pre-rRNA processing at sites, A1 and A2.....	70
2.9	EM analysis of chromatin spreads from yeast strain GAL::SNR30.....	71

2.10	Western blot analysis of tagged proteins.....	75
3.1	<i>RPS18</i> is essential for optimal growth and ribosomal function.....	99
3.2	Association of Rps18A and Rps18B with snoRNAs.....	100
3.3	Absence of Rps18A or Rps18B affects pre-rRNA processing	101
3.4	Schematic representation of <i>RPS18</i> genes and their mRNA products.....	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux		Page
2.1	Yeast strains.....	72
2.2	Oligonucleotides.....	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
CTD	Domaine C-terminal
DFC	Composante fibrillaire dense
FC	Centre fibrillaire
GC	Composante granulaire
hSHAPE	«Highthroughput selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension»
kDa	KiloDalton
kpb	Kilo paires de bases
k-turn	« kink-turn »
NoLS	Signal de localization nucléolaire
PARS	Parallel analysis of RNA structure
RNP	Ribonucléoprotéine
S	Svedberg
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine
SAM	S-adénosyl-L-méthionine
snoRNA	Petit ARN nucléolaire
snoRNP	Petite ribonucléoprotéine nucléolaire
snRNA	Petit ARN nucléaire
TMG	Coiffe triméthyl-guanosine

RÉSUMÉ

Le nucléole de la levure contient près de 100 petites ribonucléoprotéines nucléolaires (snoRNP), qui sont constituées d'une molécule d'ARN (snoRNA) et de quelques protéines. Les snoRNA forment deux grandes familles: la famille à boîtes C/D et à boîtes H/ACA. Ces snoRNA servent de guides pour des modifications post-transcriptionnelles des ARN ribosomiques (ARNr), c'est-à-dire la méthylation en 2'-OH de riboses (C/D) et la pseudouridylation (H/ACA). Certains de ces snoRNA sont requis pour des réactions de clivage sur le précurseur des ARNr; ces clivages servent à éliminer des régions espaceur dans le pré-ARNr. Contrairement aux autres snoRNA H/ACA, snR30 n'a pas de cible pour la pseudouridylation. Par contre, la snoRNP snR30 est essentielle aux clivages précoces des pré-ARNr menant à la production de l'ARNr 18S.

Le but de ces travaux de recherche est de purifier le complexe snR30 afin d'identifier et caractériser ses composantes protéiques pour déterminer leur rôle dans la fonction particulière de snR30. De plus, nous voulons mieux saisir le rôle de snR30 dans la maturation de l'ARNr. Afin d'identifier le contenu protéique de snR30, nous avons mis au point un système de purification permettant d'isoler de façon spécifique snR30; d'une part, nous avons enrichi les échantillons en snoRNP H/ACA en purifiant la protéine H/ACA Gar1 et, d'autre part, nous avons isolé spécifiquement snR30 grâce à un aptamère d'ARN introduit dans la séquence de snR30. Cette méthode de purification nous a permis de montrer une association entre snR30 et la protéine nucléolaire Nop6, les protéines ribosomiques S9 et S18, ainsi que les histones H2B et H4. Ces protéines interagissent aussi avec d'autres snoRNA.

Comme plusieurs éléments suggéraient que Nop6 était impliquée dans la biogenèse des ribosomes, nous avons voulu définir son rôle dans la maturation des ARNr. Nos analyses ont montré que Nop6 localise au nucléole et que cette protéine cosédimente avec snR30 dans un gradient de sucrose. Grâce à des expériences d'extension d'amorces, nous avons démontré que snR30 est nécessaire pour les clivages aux sites A0, A1 et A2 et que l'absence de Nop6 diminue l'efficacité de clivage au site A2. De plus, une analyse par microscopie électronique de cellules déplétées de snR30 indique que ce snoRNA est requis pour la formation du SSU processome, un complexe ribonucléoprotéique nécessaire à la biogenèse de la petite sous-unité du ribosome. L'ensemble de ces résultats suggère que le SSU processome n'est pas seulement composé du snoRNA U3 et de ses protéines associées, mais pourrait contenir plusieurs autres snoRNP, dont snR30.

On sait que certaines protéines ribosomiques ont des rôles « extraribosomiques », c'est-à-dire qu'en plus d'être des constituants du ribosome, elles ont d'autres fonctions cellulaires. Comme la protéine ribosomique Rps18 peut être associée à snR30, ceci laisse supposer qu'elle pourrait avoir un rôle dans la

maturation des ARNr. Chez la levure, Rps18 est exprimée à partir de gènes dupliqués (*RPS18A* et *RPS18B*) qui encodent des pré-ARNm dont la séquence diffère (principalement au niveau de l'intron) mais qui génèrent des protéines de séquences identiques. Afin d'étudier la fonction de Rps18, nous avons généré des souches de levures où l'expression de *RPS18A* ou *RPS18B* est modifiée. Nos résultats indiquent que ces protéines sont régulées de manières différentes et qu'elles ont des fonctions cellulaires distinctes. Nous montrons aussi qu'en plus d'être un constituant du ribosome, la protéine S18 est essentielle à la maturation de l'ARNr 18S.

Somme toute, nos résultats suggèrent que Rps18B a un rôle plus important dans la maturation des ARNr tandis que Rps18A serait plus impliquée dans l'assemblage des ribosomes.

Mots clés : Nucléole, Ribosome, Ribonucléoprotéine, Ribosomopathies, ARNr

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1.1 Le nucléole

C'est au début des années 1800 que le premier organite sous-nucléaire étudié, le nucléole, a été décrit grâce à un microscope optique (Valentin, 1836). Cependant, ce n'est que vers 1960 que le rôle « d'usine à ribosome » du nucléole a été établi, c'est-à-dire, le lieu où l'ADN ribosomique (ADNr) est gardé et transcrit et que les transcrits d'ARN ribosomiques (ARNr) sont modifiés, clivés et assemblés avec les protéines ribosomiques pour former le ribosome (McConkey et Hopkins, 1964). Aujourd'hui, plusieurs fonctions non-ribosomiques ont été associées au nucléole dont la maturation d'ARN non-nucléolaires et de ribonucléoprotéines (RNP), la sénescence et la régulation de la télomérase, la régulation du cycle cellulaire, la suppression de tumeurs et l'activité oncogénique ainsi que la détection et la signalisation lors de stress cellulaire (revue dans Raska, Shaw et Cmarko, 2006a). Une étude protéomique du nucléole de cellule HeLa a dénombré près de 700 protéines nucléolaires, ce qui suppose un caractère plurifonctionnel au nucléole (Andersen *et al.*, 2005). De plus, le nucléole est ciblé par plusieurs virus afin de prendre le contrôle des fonctions cellulaires des cellules infectées et ainsi faciliter la réplication virale (Wang *et al.*, 2010). Le protéome du nucléole est continuellement modifié en réponse aux conditions métaboliques de la cellule (Lam *et al.*, 2007). De plus, des dérèglements du nucléole ont été observés dans plusieurs maladies dont le cancer (Montanaro, Trere et Derenzini, 2008).

Le nucléole de la levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe environ un tiers du noyau et se localise à l'opposé du corps à pôle-fuseau près de la membrane nucléaire (Bystricky *et al.*, 2005). La proximité du nucléole avec la membrane nucléaire limite l'accès de la machinerie nécessaire pour la recombinaison homologue, ce qui permet de stabiliser l'ADNr et le protéger contre la recombinaison homologue (Mekhail *et al.*, 2008). Chez l'humain, on peut retrouver deux et même trois nucléoles par noyau selon l'état de la cellule (Hernandez-Verdun *et al.*, 2010). Le nucléole est divisé en trois parties, soit le centre fibrillaire (FC), la composante fibrillaire dense (DFC) et la composante granulaire (GC; Figure 1.1; Raska, Shaw et Cmarko, 2006a). Le FC contient le facteur de transcription UBF et est riche en ARN polymérase I, l'enzyme responsable de la synthèse d'ARNr. Le DFC entoure partiellement le FC. Chez l'humain, le DFC contient les protéines fibrillarine et nucléoline ainsi que les protéines Gar1, Nhp2 et Nop10 (Mongelard et Bouvet, 2007 ; Pogacic, Dragon et Filipowicz, 2000). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'ARN polymérase I ainsi que les protéines Nop1 et Gar1 localisent au DFC (Léger-Silvestre *et al.*, 1999). Autour du FC et du DFC se trouve le GC où des pré-ribosomes en maturation, des protéines ribosomiques, des facteurs requis pour l'assemblage des ribosomes ainsi que des protéines associées à la prolifération cellulaire peuvent se localiser (Huang, 2002 ; MacCallum et Hall, 2000). Le GC contient aussi des régions contenant des complexes protéiques mais dénudés d'ARN (Politz *et al.*, 2005).

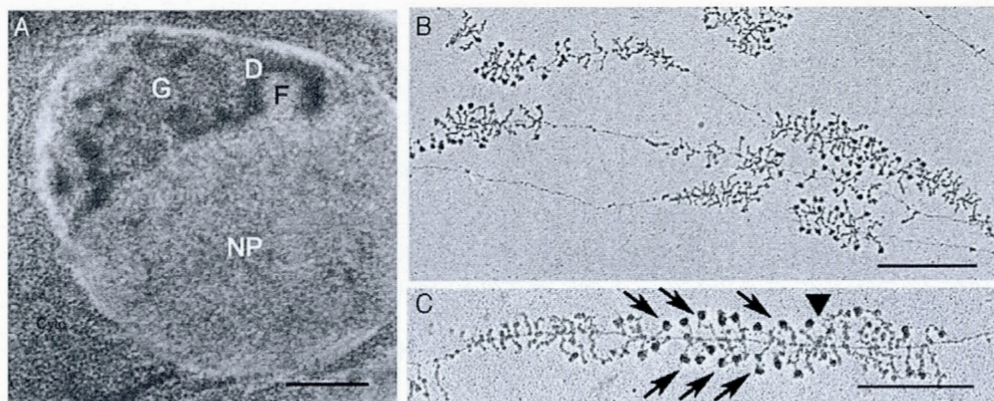


Figure 1.1 : Observation de structures nucléolaires de levure et d'étalements de chromatine nucléolaire par microscopie électronique. A) Couche mince d'un nucléole de levure fixé *in situ*. Les lettres F, D, G et NP correspondent respectivement au FC, DFC, GC et au nucléoplasme. B et C) Étalement de chromatine nucléolaire observée par microscopie électronique. En C), les flèches indiquent les granules terminaux à l'extrémité 5' du transcrit nouvellement synthétisé. La disparition des granules terminaux reflète le clivage co-transcriptionnel (triangle) qui permet de libérer le pré-18S (figure tirée de Raska, Shaw et Cmarko, 2006a). Les valeurs des barres d'échelle sont de 0,25 μm en A), 1,0 μm en B) et 0,5 μm en C).

Le nucléole se désassemble de façon séquentielle au début de la mitose en débutant par le relargage des complexes de maturation de l'ARNr suivi de la répression de la transcription par l'ARN polymérase I (Hernandez-Verdun, 2011). À la fin de la prophase, quand l'enveloppe nucléaire se désagrège et que les chromosomes sont condensés, le nucléole n'est plus visible. La phosphorylation de certaines protéines nucléolaires serait responsable de la répression de la transcription par l'ARN polymérase I et de la répression des complexes de maturation des ARNr (Hernandez-Verdun, 2011). Le nucléole est assemblé durant la télophase, lorsque les protéines nucléoline, fibrillarine, nucléophosmine ainsi que d'autres facteurs forment des foci nucléolaires (Hernandez-Verdun, Roussel et Gebrane-Younes, 2002).

1.1.2 Localisation nucléolaire.

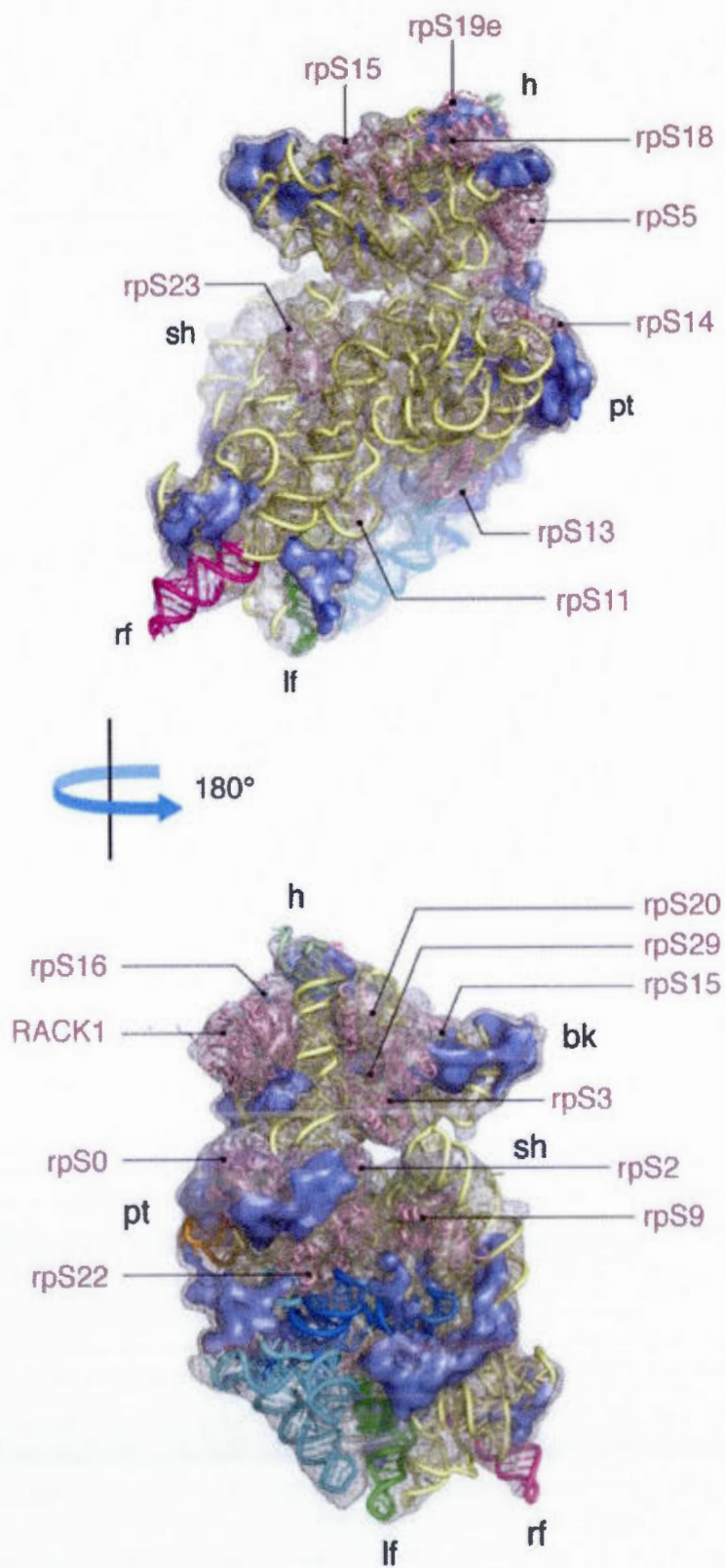
Pour qu'une protéine soit ciblée au nucléole, elle doit posséder un signal de localisation nucléolaire (NoLS). Les NoLS sont généralement composés d'arginines et de lysines et la taille de ces motifs peut être aussi petite que sept ou huit acides aminés (aa) et aller jusqu'à 30 aa (Birbach *et al.*, 2004 ; Reed *et al.*, 2006). Le type de NoLS pourrait aussi déterminer la localisation de protéines nucléolaires dans les sous-compartiments du nucléole (Emmott et Hiscox, 2009). L'activité des NoLS peut aussi être régulée de façon post-traductionnelle (Catez *et al.*, 2002). Selon le modèle actuel de dynamique nucléaire, les protéines diffusent librement dans l'espace nucléaire, incluant le nucléole (Raska, Shaw et Cmarko, 2006b). La plupart des protéines nucléolaires ne demeurent que quelques dixièmes de secondes dans le nucléole. Ce même modèle explique que les protéines nucléolaires ne sont pas recrutées par un mécanisme de transport actif au nucléole grâce au NoLS mais plutôt par un mécanisme d'interaction du NoLS avec d'autres macromolécules déjà présentes dans le nucléole. Le nucléole s'assemble probablement autour de protéines centrales qui permettent l'association de plusieurs partenaires protéiques. L'assemblage de ces partenaires protéiques pourrait dépendre de la position de certaines protéines et/ou du moment auquel ces protéines s'associent l'une à l'autre dans le nucléole. Les NoLS pourraient être reconnus par ces protéines centrales qui elles se retrouvent près de l'ADNr (Emmott et Hiscox, 2009). Pour le nucléole, ainsi que pour les autres structures sous-nucléolaires, le terme « signal de rétention » serait plus approprié pour décrire les NoLS.

1.1.3 Le ribosome

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques présents chez tous les organismes vivants. Ils se trouvent dans le cytoplasme, soit libres ou associés; lorsqu'ils sont associés, ils le sont soit aux membranes du réticulum endoplasmique, soit à l'enveloppe nucléaire. On trouve aussi des ribosomes dans les mitochondries et certains plastes, et leur structure est proche de celle des ribosomes procaryotes

(Gillham et Boynton, 1981). Les ribosomes sont les «machines» cellulaires qui assurent la traduction des ARN messagers (ARNm) et la formation des liens peptidiques lors de la synthèse des protéines. Ils sont composés majoritairement d'ARNr mais aussi de protéines ribosomiques et sont divisés en deux sous-unités (Figure 1.2). Chez les eubactéries, la petite sous-unité est composée de l'ARNr 16S et de 21 protéines ribosomiques tandis que la grande sous-unité est composée des ARNr 23S et 5S ainsi que 34 protéines ribosomiques. Quoique très conservé au cours de l'évolution, le ribosome eucaryote est différent tant au niveau de la petite sous-unité, qui est composée de l'ARNr 18S et d'un peu plus de 30 protéines ribosomiques (32 chez la levure et 33 chez l'humain), qu'au niveau de la grande sous-unité, qui elle est composée des ARNr 25/28S, 5.8S et 5S ainsi que d'un peu moins de 50 protéines ribosomiques (46 chez la levure et 49 chez l'humain; Klinge *et al.*, 2011 ; Rabl *et al.*, 2011 ; Taylor *et al.*, 2009). Le ribosome est un ribozyme puisque aucune protéine n'est présente au site actif où les liens peptidiques sont formés (Rodnina et Wintermeyer, 2003). La petite sous-unité du ribosome décode le message génétique contenu dans les ARNm et est responsable de l'initiation du chargement de l'ARNm dans le ribosome, du contrôle de la translocation de l'ARNm et de l'ARNt ainsi que du contrôle de la fidélité de l'interaction codon-anticodon, tandis que la grande sous-unité est responsable de la formation des liens peptidiques (Schlunzen *et al.*, 2000).

A



B

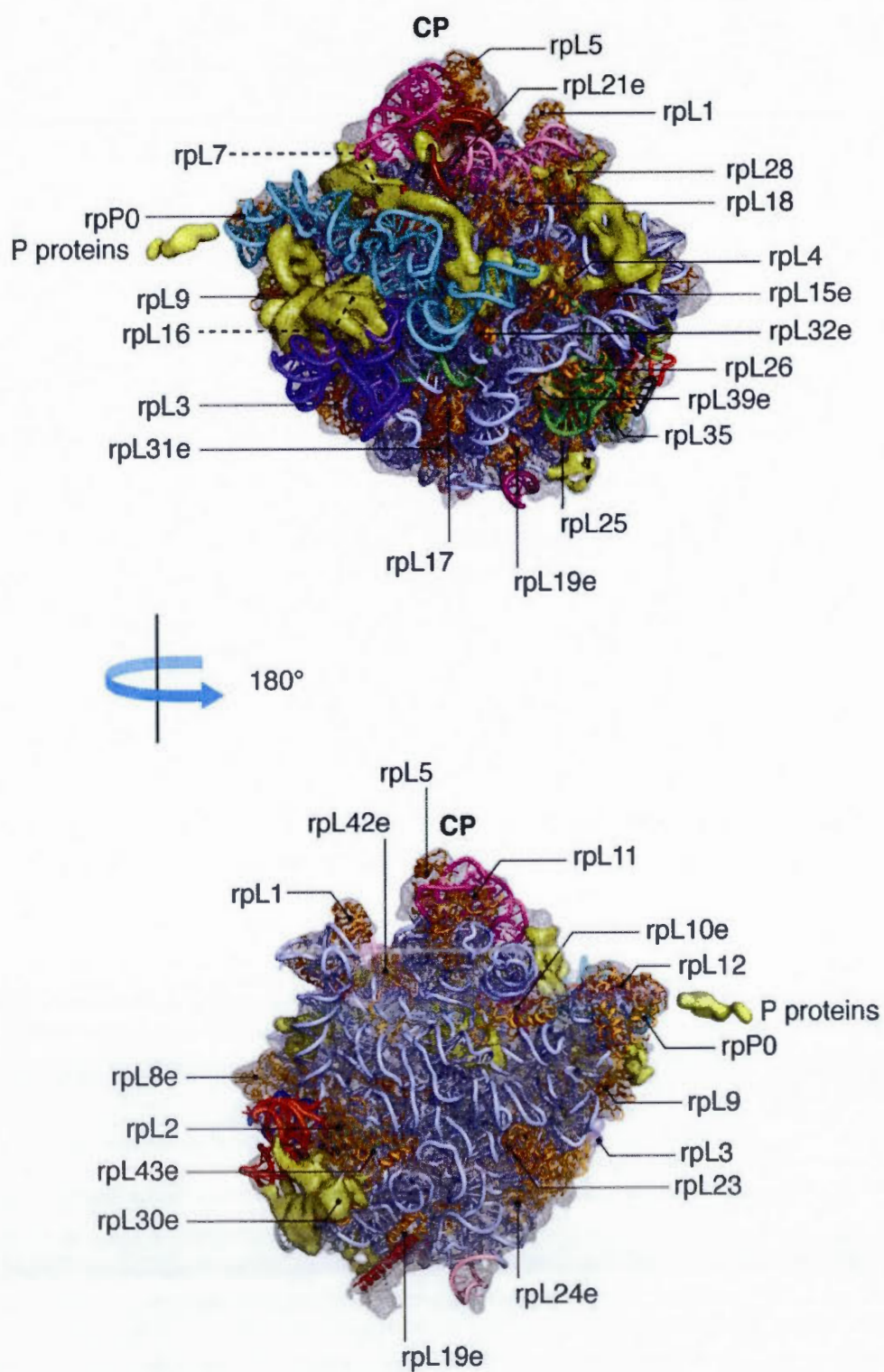


Figure 1.2 : Structure des sous-unités ribosomiques de la levure *S. cerevisiae*. A) Modèle atomique de la petite sous-unité 40S. L'ARNr est représenté par des tubes et les protéines ribosomiques ayant des homologues connus chez les eubactéries sont colorées en rose. Les différentes régions de la petite sous-unité sont aussi identifiées; h = tête (head), bk = bec (beak), sh = épaule (shoulder), pt = plateforme (platform), lf = pied gauche (left foot) et rf = pied droit (right foot). B) Modèle atomique de la grande sous-unité 60S. L'ARNr est représenté par des tubes (5S magenta et 5.8S vert) et les protéines ribosomiques ayant des homologues connus chez les eubactéries sont colorées en orange. Image tirée de Taylor *et al.* (2009).

1.1.4 Les petits ARN nucléolaires (snoRNA)

Le nucléole de la levure contient un peu moins de 80 snoRNA. Les snoRNA fonctionnent sous forme de complexes associés à quelques protéines (snoRNP; Dragon, Lemay et Trahan, 2006 ; Filipowicz et Pogacic, 2002). Ces snoRNA sont impliqués dans la maturation de l'ARNr, mais aussi des petits ARN nucléaires (snRNA), des ARN de transfert (ARNt) et possiblement des ARNm (Bachellerie, Cavaillé et Huttenhofer, 2002). Les snoRNP peuvent aussi jouer un rôle dans la médiation du stress métabolique, la régulation de l'épissage alternatif, l'édition des ARN et peuvent réguler à la baisse l'expression de certains gènes (Watkins et Bohnsack, 2011). Les snoRNA sont divisés en deux grandes familles. Cette classification est basée sur la présence de motifs conservés, soit les boîtes C et D (snoRNA C/D) ou les boîtes H et ACA (snoRNA H/ACA). Les snoRNA d'une même famille adoptent une structure secondaire similaire (Figure 1.3). Pour ce qui est de la RNase MRP, c'est une snoRNP unique qui n'est ni C/D, ni H/ACA, et elle est impliquée dans le clivage au site A3 en amont de l'ARNr 5.8S (Lygerou *et al.*, 1996).

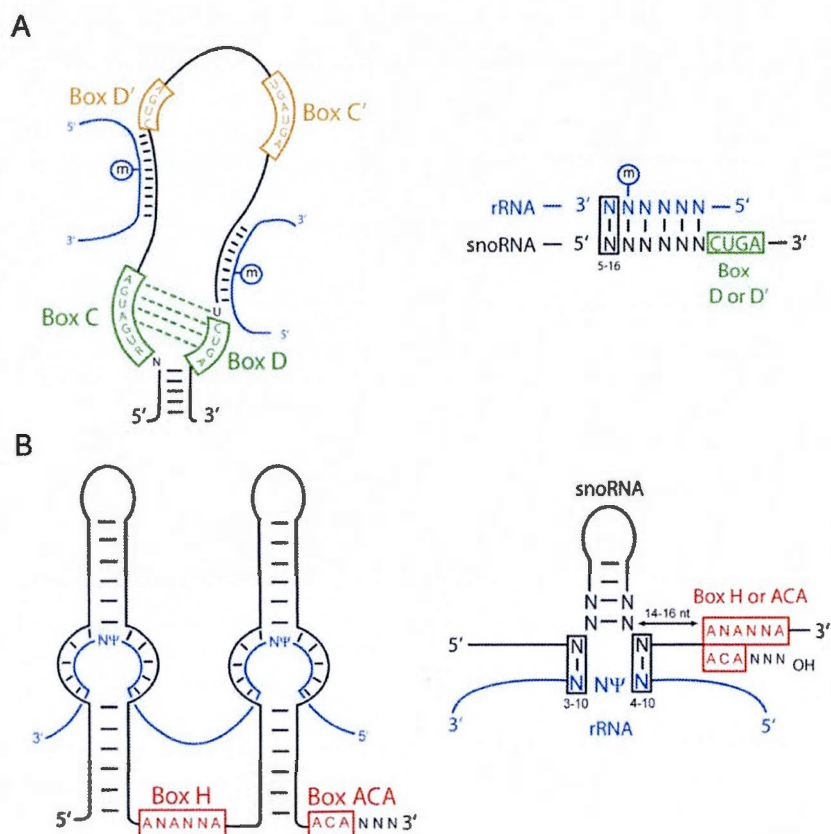


Figure 1.3 : Structure secondaire des snoRNA. A) Les snoRNA C/D adoptent une structure secondaire où les boîtes C et D situées près des extrémités 3' et 5' se retrouvent une en face de l'autre et forment des paires de bases, la plupart non-canoniques. Il est aussi possible de trouver des boîtes C et D alternatives (C' et D'). L'ARNr s'apparie dans une région complémentaire en amont de la boîte D et la méthylation est effectuée sur le 5^e nucléotide. B) La structure secondaire des H/ACA consiste en une tige-boucle suivie d'une région charnière où se situe la boîte H (ANANNA), suivie d'une deuxième tige-boucle et se terminant par une queue dans laquelle on retrouve la boîte ACA, trois nucléotides en amont de l'extrémité 3'. L'ARNr s'apparie à un motif bipartite dans le haut de la boucle de pseudouridylation et l'uridine libre située à une distance de 14 à 16 nucléotides de la boîte H ou ACA est modifiée en pseudouridine. Image tirée de Dragon, Lemay et Trahan (2006).

Certaines de ces snoRNP comme les C/D U3, U14, U8 et U22 ainsi que les H/ACA snR30/U17 et snR10 sont impliquées dans des réactions de clivage du pré-35S, précurseur des ARNr 18S, 25S et 5.8S (Henras *et al.*, 2008). La majeure partie de ce que nous connaissons au niveau de la structure tridimensionnelle des snoRNP nous provient de structures à haute résolution obtenues de complexes C/D et H/ACA chez les archéobactéries (Watkins et Bohnsack, 2011).

Les snoRNA C/D possèdent les motifs PuUGAUAG (Boîte C) et CUGA (Boîte D) situés près des extrémités 5' et 3', respectivement (Figure 1.3). Les motifs C et D sont appariés, formant un « kink-turn » (k-turn), un motif conservé au cours de l'évolution, présent aussi dans l'ARNr et reconnu pour lier des protéines spécifiques (Klein *et al.*, 2001 ; Watkins *et al.*, 2000). La plupart des snoRNA C/D possèdent des boîtes C et D alternatives (C' et D'); ces boîtes sont séparées par une courte séquence d'espacement et forment un motif « k-loop » similaire au k-turn (Reichow *et al.*, 2007 ; van Nues *et al.*, 2011). Les boîtes C/D et C'/D' forment des plateformes distinctes pour la liaison des protéines C/D spécifiques (Reichow *et al.*, 2007). Les snoRNA C/D possèdent une ou deux longue(s) séquence(s) complémentaire(s) à des séquences retrouvées dans leur ARN cible. Ces séquences font 10 à 21 nt et se retrouvent juste en amont des boîtes D et D'. Les snoRNA C/D sont impliqués dans les réactions post-transcriptionnelles de méthylation en 2'-OH de riboses spécifiques (Kiss-Laszlo *et al.*, 1996). C'est le nucléotide apparié avec le cinquième nucléotide en amont de la boîte D ou D' qui sera modifié. Lors de la réaction de méthylation, le groupement thio-méthyl du donneur S-adenosyl-L-méthionine (SAM), est transféré au groupement 2'-OH lors de la conversion de SAM en S-adenosyl-L-homocystéine (SAH; Figure 1.4; Liang et Li, 2011). Ce type de modification pourrait participer à la bonne conformation de l'ARNr en modifiant la conformation locale ou encore à sa stabilité puisque les résidus méthylés sont résistants aux nucléases (Cavaillé, Nicoloso et Bachellerie, 1996). Tous les snoRNA C/D eucaryotes sont associés aux protéines Nop1 (fibrillarine chez l'humain), Nop56, Nop58 et Snu13 (15.5K chez l'humain).

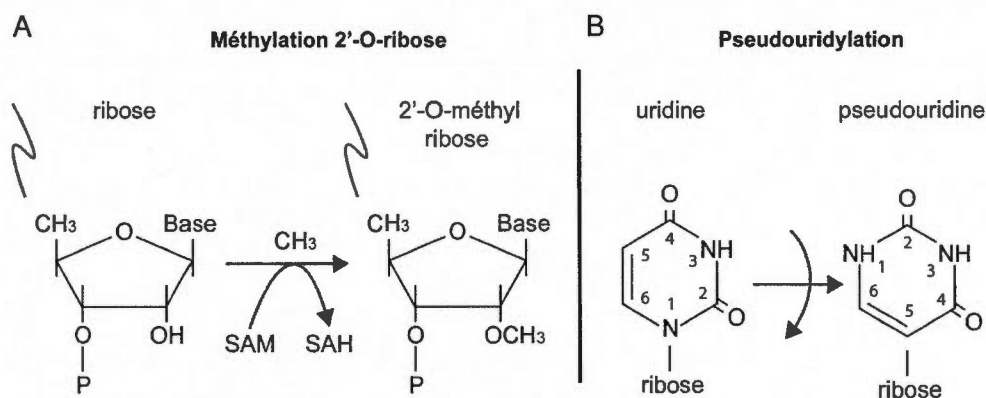


Figure 1.4. Modifications post-transcriptionnelles effectuées par les snoRNP. A) Méthylation en 2'-OH du ribose guidée par les snoRNP C/D. SAM est le donneur du groupement thio-méthyl. B) Pseudouridylation ou isomérisation d'uridines en pseudouridines guidée par les snoRNP H/ACA.

Les snoRNA H/ACA possèdent une structure secondaire composée d'une tige-boucle suivie d'une région charnière où se situe la boîte H (ANANNA, où N est n'importe quel nucléotide), suivie d'une deuxième tige-boucle et se terminant par une région simple brin contenant la boîte ACA toujours située trois nucléotides en amont de l'extrémité 3' (Balakin, Smith et Fournier, 1996 ; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss, 1997). Les tige-boucles sont généralement interrompues par des boucles internes, nommées boucles de pseudouridylation situées près de la base de la tige-boucle. Ces boucles internes contiennent deux courtes séquences formant un motif bipartite complémentaire à leur ARN cible. Les snoRNA H/ACA sont impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles de pseudouridylation (Ganot, Bortolin et Kiss, 1997 ; Ni, Tien et Fournier, 1997). Les pseudouridines, isomères obtenus de la

pseudouridylation, sont les nucléotides modifiés les plus répandus; elles sont tellement répandues qu'on nomme aussi la pseudouridine «le cinquième nucléotide» après les quatre nucléotides primaires soit A, G, C et U (Liang et Li, 2011). Cette modification consiste en un clivage du lien glycosyl N₁-C₁ suivi d'une rotation de la base et reformation d'un lien entre les carbones C₅ et C₁ (Ni, Tien et Fournier, 1997). L'uridine ciblée pour modification est positionnée 14-16 nucléotides de la boîte H ou ACA, au centre de la boucle de pseudouridylation. Lorsque l'ARN cible est apparié au snoRNA, on retrouve deux nucléotides libres entre les deux séquences du motif bipartite. C'est l'uridine en 5' qui sera modifiée en pseudouridine. La pseudouridylation aide à stabiliser l'ARN par l'ajout d'une liaison hydrogène à la position N1 de l'uridine (Durant et Davis, 1999 ; Newby et Greenbaum, 2002). Les boîtes H et ACA sont importantes pour la stabilité et l'accumulation des snoRNA H/ACA. (Balakin, Smith et Fournier, 1996 ; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss, 1997). Pour leur part, les snoRNA H/ACA eucaryotes sont tous associés aux protéines Cbf5 (dyskérine chez l'humain), Gar1, Nhp2 et Nop10.

La méthylation en 2' de riboses et la pseudouridylation ne sont que deux parmi plus de 100 modifications chimiques que peuvent subir les ARN. Cependant, le grand nombre de ces deux modifications retrouvées dans les ARNr, mais aussi dans les snRNA, démontre leurs rôles cellulaires importants. L'absence de ces modifications dans l'ARNr empêche la traduction et retarde la maturation des pré-ARNr (Baudin-Baillieu *et al.*, 2009 ; Liang, Liu et Fournier, 2007, 2009 ; Piekna-Przybylska *et al.*, 2008). Lorsque ces modifications ne sont pas correctement ciblées, ceci a un impact négatif sur la synthèse de ribosomes ainsi que sur leur activité (Liu *et al.*, 2008). Les ARN modifiés sont reconnus pour être plus stables que des ARN non-modifiés. De plus, les modifications chimiques des ARN augmentent le nombre de groupements fonctionnels de ces molécules (Liang et Li, 2011).

1.1.5 Les protéines associées aux snoRNA C/D

Comme mentionné précédemment, les snoRNA C/D chez *S. cerevisiae* sont associés aux protéines Nop1, Nop58, Nop56 et Snu13 (Figure 1.5). La protéine fibrillarine (Nop1) a été identifiée pour la première fois en 1985 par Ochs *et al.* (1985). C'est seulement quatre ans plus tard que Nop1, une protéine d'environ 35 kDa, a été identifiée comme étant l'homologue de fibrillarine (Schimmang *et al.*, 1989). Nop1 est la méthyltransférase du complexe (Galardi *et al.*, 2002). Elle possède d'ailleurs un domaine retrouvé chez les méthyltransférases dépendante de SAM (Galardi *et al.*, 2002 ; Niewmierzycka et Clarke, 1999). Nop1 est requise pour l'accumulation et la localisation nucléolaire des snoRNA C/D (Verheggen *et al.*, 2001). Nop1 interagit avec les nucléotides 1 à 6 de la séquence guide du snoRNA (Lin *et al.*, 2011). Pour se lier aux snoRNA C/D, Nop1 requiert l'interaction entre la protéine Snu13 (15.5K chez l'humain et L7ae chez les archéobactéries) et le snoRNA. Snu13, une protéine d'environ 13 kDa, peut lier directement le «k-turn» formé par les boîtes C et D ainsi que s'associer avec le «k-loop» des boîtes C'/D' par des interactions protéines-protéines (Qu *et al.*, 2011). Comme Nop1, la protéine Snu13 est requise pour l'accumulation et la localisation nucléolaire des snoRNA C/D (Verheggen *et al.*, 2001). L'homodimère formé par la protéine Nop5 chez les archéobactéries est remplacé chez les eucaryotes par un hétérodimère composé des protéines Nop58 et Nop56 (Watkins et Bohnsack, 2011). Ces deux protéines d'environ 58 et 56 kDa respectivement auraient un rôle dans la reconnaissance de l'ARN ciblé par les snoRNA C/D (van Nues *et al.*, 2011). Nop58 et Nop56 vont s'associer de façon préférentielle aux motifs C/D et C'/D', respectivement (Cahill *et al.*, 2002).

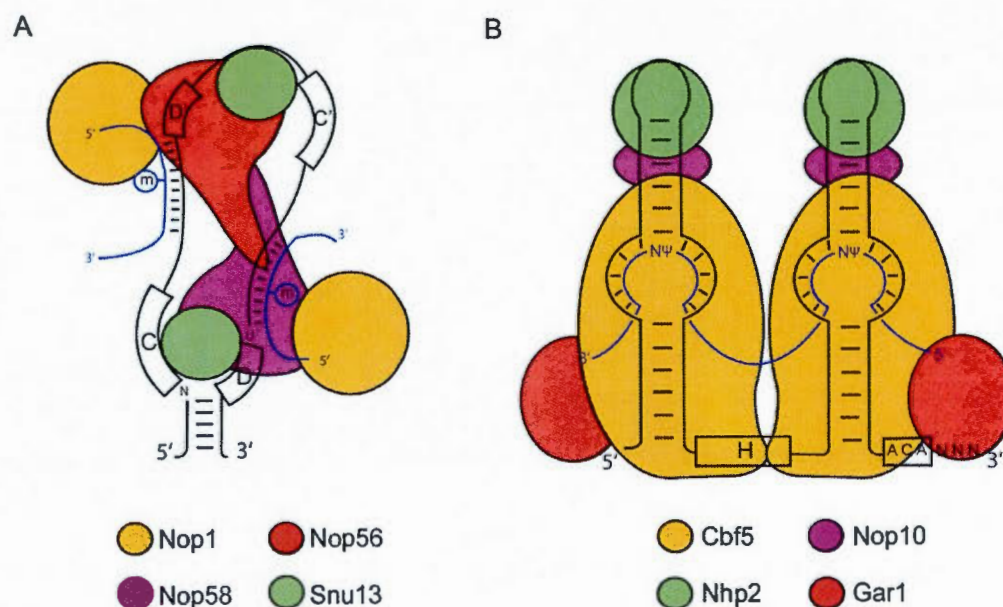


Figure 1.5. Protéines associées aux snoRNA. A) Représentation de la disposition des protéines associées aux snoRNA C/D soit Nop1/fibrillarine, Nop56, Nop58 et Snu13 (15.5 K chez l'humain). La structure secondaire des snoRNA C/D est représentée en noir, les boîtes C/C' et D/D' sont identifiées, l'ARN ciblé pour modification est en bleu et la position du nucléotide modifié est indiquée (m). B) Représentation de la disposition des quatre protéines H/ACA, Cbf5/dyskérine, Gar1, Nhp2 et Nop10. La structure secondaire des snoRNA H/ACA est représentée en noir, les boîtes H et ACA sont identifiées, l'ARN ciblé pour modification est en bleu et la position de l'uridine modifiée est indiquée (ψ).

1.1.6 Les protéines associées aux snoRNA H/ACA

Comme les snoRNA C/D, les snoRNA H/ACA matures sont associés à quatre protéines, soit Cbf5, Gar1, Nhp2 et Nop10 (Figure 1.5). Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Cbf5 a une masse de 64 kDa et a été découverte en recherchant des protéines liant le centromère (Jiang *et al.*, 1993). Cbf5 est une pseudouridine synthase car elle possède des domaines d'homologie avec la pseudouridine synthase TruB d'*Escherichia coli*. Un de ces domaines est un domaine de liaison à l'uridine tandis que le second est le domaine catalytique. Cbf5 est essentielle à la production de l'ARNr 18S. Elle est aussi essentielle à l'accumulation des snoRNA H/ACA et de Gar1. Finalement, Cbf5 est nécessaire à l'activité de pseudouridylation (Lafontaine *et al.*, 1998). Chez les mammifères, dyskérine/NAP57, l'homologue de Cbf5, interagit avec la protéine Nopp140 qui se retrouve dans le nucléole et les corps de Cajal et qui servirait de transporteur entre le nucléole et le cytoplasme (Meier et Blobel, 1992). Cbf5 interagit avec le haut de la tige-boucle (au-dessus de la boucle de pseudouridylation) du snoRNA et avec la boîte ACA; l'interaction avec la boîte ACA se fait via le domaine PUA de Cbf5 (Li et Ye, 2006). Nhp2 est une protéine qui fait environ 22 kDa. Il a été démontré que cette protéine peut lier des snoRNA H/ACA directement *in vitro* et son domaine central est un domaine de liaison à l'ARN. Nhp2 possède un haut degré d'homologie avec d'autres protéines liant l'ARN, dont Rpl32 et Snul3 (15.5K). Ces protéines proviendraient possiblement d'un ancêtre commun nommé L7ae (Nottrott *et al.*, 1999 ; Vilardell et Warner, 1997). Nhp2 est essentielle à la production de l'ARNr 18S, à l'accumulation des snoRNA H/ACA et de la protéine Gar1 ainsi qu'à l'activité de pseudouridylation (Henras *et al.*, 1998 ; Watkins *et al.*, 1998). Nop10 est une protéine dont la masse moléculaire est 6,6 kDa et qui est essentielle à la production de l'ARN 18S, aux réactions de pseudouridylation et à l'accumulation des snoRNA H/ACA (Henras *et al.*, 1998). La protéine Gar1 est nécessaire à la production de l'ARNr 18S (Girard *et al.*, 1994). Cette protéine de 25 kDa possède des domaines riches en glycines et arginines (GAR). Ces domaines

contiennent plusieurs motifs RGG répétés. Les domaines GAR seraient des domaines de liaison à l'ARN mais ils ne sont pas nécessaires à la viabilité ; seulement le domaine central de la protéine est indispensable (Girard *et al.*, 1994). Gar1 est aussi essentielle aux réactions de pseudouridylation des ARNr. Par contre, la déplétion de Gar1 n'affecte pas l'accumulation des snoRNA H/ACA (Bousquet-Antonelli *et al.*, 1997). Les protéines Cbf5, Nop10 et Nhp2 peuvent former un complexe sans ARN avant de lier le snoRNA (Trahan et Dragon, 2009 ; Wang et Meier, 2004). La portion supérieure des tige-boucles des snoRNA H/ACA est liée par les protéines Nhp2 et Nop10 ainsi que le domaine catalytique de Cbf5 tandis que la portion inférieure des tige-boucles et la boîte H ou ACA sont liées par le domaine PUA de Cbf5 (Li et Ye, 2006 ; Li *et al.*, 2011b). La protéine Gar1 ne se lie pas à l'ARN mais plutôt à Cbf5, près du domaine catalytique, et sert à contrôler l'entrée et la sortie du substrat (Duan *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2011b). Naf1 est une protéine qui est requise lors de la maturation des ARNr. Cette protéine est localisée au noyau mais n'est pas une composante des snoRNP H/ACA. Par contre, elle est nécessaire à l'accumulation des snoRNA H/ACA. Il a été démontré que Naf1 liait l'ARN *in vitro* et lie directement Cbf5. Naf1 s'associe à Cbf5 via le même site de liaison que Gar1 de façon compétitive; lorsque Naf1 quitterait la snoRNP, ceci entraînerait un remodelage de la snoRNP permettant la liaison de Gar1 formant ainsi une snoRNP mature (Darzacq *et al.*, 2006 ; Leulliot *et al.*, 2007). Il a été montré par crible double-hybride que Naf1 lie aussi la forme phosphorylée du domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II (Fatica, Dlakic et Tollervey, 2002). Ceci tend à montrer que Naf1 pourrait être recruté par le CTD lors de la transcription de snoRNA H/ACA, ce qui favoriserait l'assemblage des snoRNP. Dans cette optique, différents chercheurs ont démontré que Naf1, Cbf5 et possiblement Nhp2 étaient recrutées lors de la transcription de snoRNA H/ACA (Ballarino *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2005). D'autres travaux montrent plutôt que ces protéines formeraient un complexe (tétramère) dans le cytoplasme avant de s'associer à l'ARN H/ACA dans le noyau et que cette association requiert la synthèse *de novo* d'ARN (Wang et Meier, 2004). Finalement,

Shq1 est une autre protéine requise pour la maturation des snoRNP H/ACA. Shq1 peut lier Cbf5 grâce à son domaine C-terminal et serait une chaperone nécessaire aux étapes précoces de maturation des RNP H/ACA; elle servirait à protéger les complexes protéiques contenant Cbf5 des interactions non-spécifiques d'ARN et de l'agrégation avant l'assemblage des snoRNP H/ACA (Li *et al.*, 2011a).

1.1.7 Expression des snoRNA

Au cours de l'évolution, les cellules ont développé différentes façons de transcrire les snoRNA (Figure 1.6; revue dans Brown, Echeverria et Qu, 2003 ; Dieci, Preti et Montanini, 2009). Les snoRNA peuvent être exprimés à partir de promoteurs indépendants; les produits des gènes à promoteurs indépendants peuvent être des snoRNA monocistroniques ou bien des précurseurs polycistroniques. La majorité des snoRNA produits à partir de promoteurs indépendants sont transcrits par l'ARN polymérase II. Cependant, certains promoteurs de snoRNA contiennent des éléments qui sont reconnus par la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase III. Parmi les promoteurs de snoRNA qui répondent à l'ARN polymérase III, certains possèdent des éléments typiques de gènes d'ARN de transfert (boîtes A et B). D'autres snoRNA peuvent être exprimés à partir d'introns de pré-ARNm. On retrouve généralement un snoRNA par intron, mais un pré-ARNm peut contenir plusieurs snoRNA, ce qui permet la production d'un grand nombre de snoRNA avec peu de gènes. Les snoRNA retrouvés dans un pré-ARNm peuvent être de la même famille (tous C/D ou H/ACA) ou de familles différentes (mélange de C/D et H/ACA). Les gènes codants contenant des snoRNA expriment généralement des protéines impliquées dans la synthèse de ribosomes ou dans leur fonction. Cependant, il existe des gènes hôtes qui contiennent des snoRNA sans pour autant coder pour une protéine (Huang *et al.*, 2005).

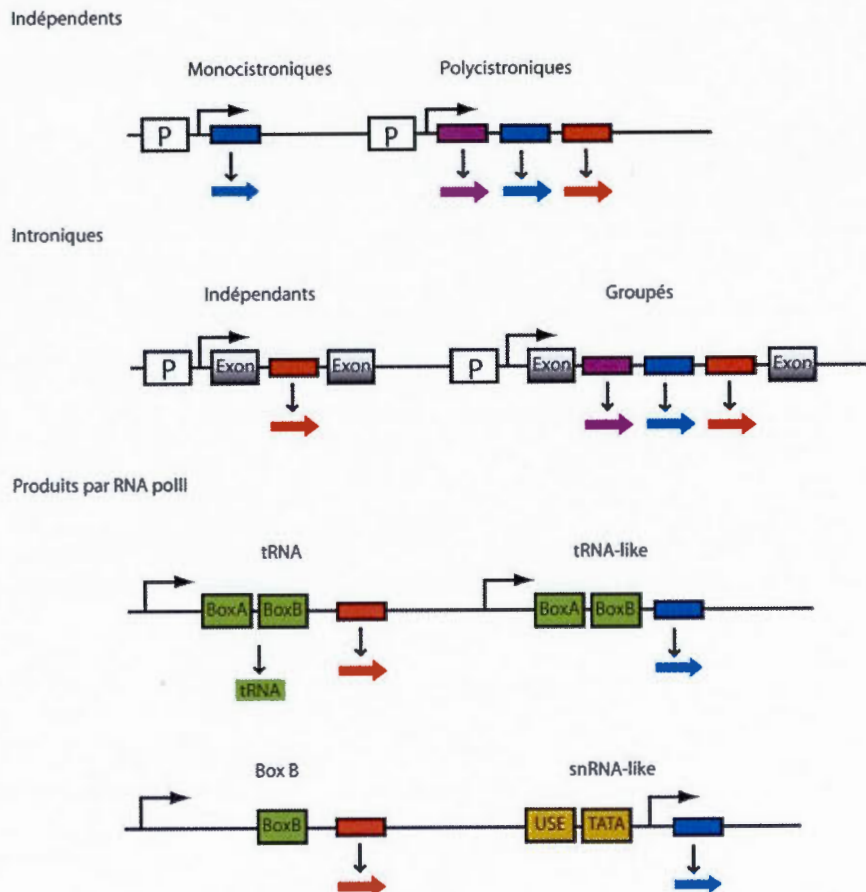


Figure 1.6 : Expression des petits ARN nucléolaires. Les snoRNA peuvent être exprimés à partir de gènes indépendants, soit un seul par gène (monocistroniques) ou plusieurs par gène (polycistroniques). Les snoRNA peuvent aussi être exprimés à partir d'introns de pré-ARNm, avec un seul (indépendants) ou plusieurs (groupés) snoRNA par introns. Les snoRNA indépendants et introniques sont des produits de l'ARN polymérase II. Certains snoRNA sont produits par l'ARN polymérase III, soit de façon similaire aux ARNt (tRNA, tRNA-like et Box B) ou de façon similaire aux petits ARN nucléaires (snRNA-like). Les boîtes A et B, les exons, les motifs en amont (USE), la boîte TATA et les ARNt sont identifiés. Les boîtes blanches correspondent aux régions promotrices (P), les boîtes colorées aux séquences d'ADN des snoRNA et les flèches colorées aux snoRNA.

La plupart des snoRNA chez la levure *S. cerevisiae* sont encodés par des gènes indépendants. Par contre, chez cet organisme il existe sept snoRNA qui sont introniques et cinq qui sont encodés dans des polycistrons. Contrairement à la levure, la grande majorité des snoRNA des vertébrés sont encodés dans les introns de pré-ARNm. Chez l'humain, seulement quatre snoRNA (U3, U8, U13 et 7-2/MRP) sont produits par des gènes indépendants. Chez les plantes, les snoRNA sont produits majoritairement à partir de polycistrons, c'est-à-dire contenant plus d'un snoRNA par unité de transcription; comme aucun exon ne se retrouve entre les différents snoRNA, ce sont des clivages par des endonucléases et non l'épissage qui sont responsables de leur production. Exceptionnellement chez les plantes, certains introns peuvent contenir plus d'un snoRNA (Brown, Echeverria et Qu, 2003)

1.1.8 Maturation des ARNr

Au cours des vingt dernières années, notre compréhension de la maturation des ARNr chez les eucaryotes s'est grandement approfondie (Mullineux et Lafontaine, 2012). Nous connaissons maintenant la majorité des facteurs cellulaires impliqués dans ce processus et nous avons une meilleure idée globale de la façon dont la maturation des ARNr se déroule. Par contre, comment les différents facteurs fonctionnent et interagissent pour mener aux formes matures des ARNr reste encore à être élucidé. Parmi ces différents facteurs, on dénombre au moins 170 facteurs protéiques, dont différentes exonucléases et endonucléases ainsi que des ARN hélicases (Fromont-Racine *et al.*, 2003 ; Kressler, Linder et de La Cruz, 1999 ; Venema et Tollervey, 1999). De plus, les snoRNA, agissant sous forme de complexes associés à quelques protéines (snoRNP), sont impliqués dans ce processus. Environ une centaine de ces complexes ribonucléoprotéiques participent à la maturation des ARNr (Bachellerie, Cavaillé et Qu, 2000). Comme mentionné précédemment, c'est dans le nucléole que se déroule la majeure partie de la biogenèse des ribosomes. L'initiation de la transcription de l'ADNr s'effectue dans le FC et le DFC, les étapes précoces de maturation de l'ARNr se font dans le DFC et les étapes tardives de

maturation dans le GC (Hernandez-Verdun, 2011). La biogenèse des ribosomes est un processus très important pour la croissance cellulaire; les cellules de levure synthétisent environ 2000 ribosomes par minute, ce qui requiert 60% de la transcription cellulaire totale de la cellule et l'utilisation des trois ARN polymérases (Warner, 1999).

Chez *S. cerevisiae*, l'ADNr se retrouve en plusieurs unités de transcription organisées en tandem, tête à queue, sur le chromosome XII et faisant environ 9,1 kpb. Chacune de ces unités est transcrite en un pré-ARNr qui peut comporter jusqu'à environ 6,6 kb. Pendant la transcription, ce précurseur subit différentes modifications post-transcriptionnelles; principalement la méthylation des riboses et la pseudouridylation mais aussi la méthylation de bases (revu dans Maden et Hughes, 1997). Le précurseur est aussi clivé à différents sites afin d'éliminer les régions espaceur menant à la formation des ARNr matures 18S, 5.8S et 25S (Figure 1.7; revu dans Kressler, Linder et de La Cruz, 1999).

Les complexes nécessaires aux clivages des pré-ARNr s'assemblent pendant la transcription et peuvent être visualisés par microscopie électronique. Ces complexes apparaissent comme des granules à l'extrémité 5' des transcrits nouvellement synthétisés formant ce qu'on appelle des structures en «arbre de Noël» (Figure 1.1). La formation des granules terminaux et les clivages qui s'ensuivent requièrent le snoRNA U3 ainsi que toutes les protéines qui lui sont associées et les snoRNA snR30 et U14 (Dragon *et al.*, 2002 ; Lemay *et al.*, 2011 ; Osheim *et al.*, 2004). Le complexe U3 va lier le transcrit du pré-ARNr pendant la transcription pour former une petite particule (particule 5'-ETS) qui va se condenser avec le pré-ARNr ainsi que plusieurs facteurs additionnels pour

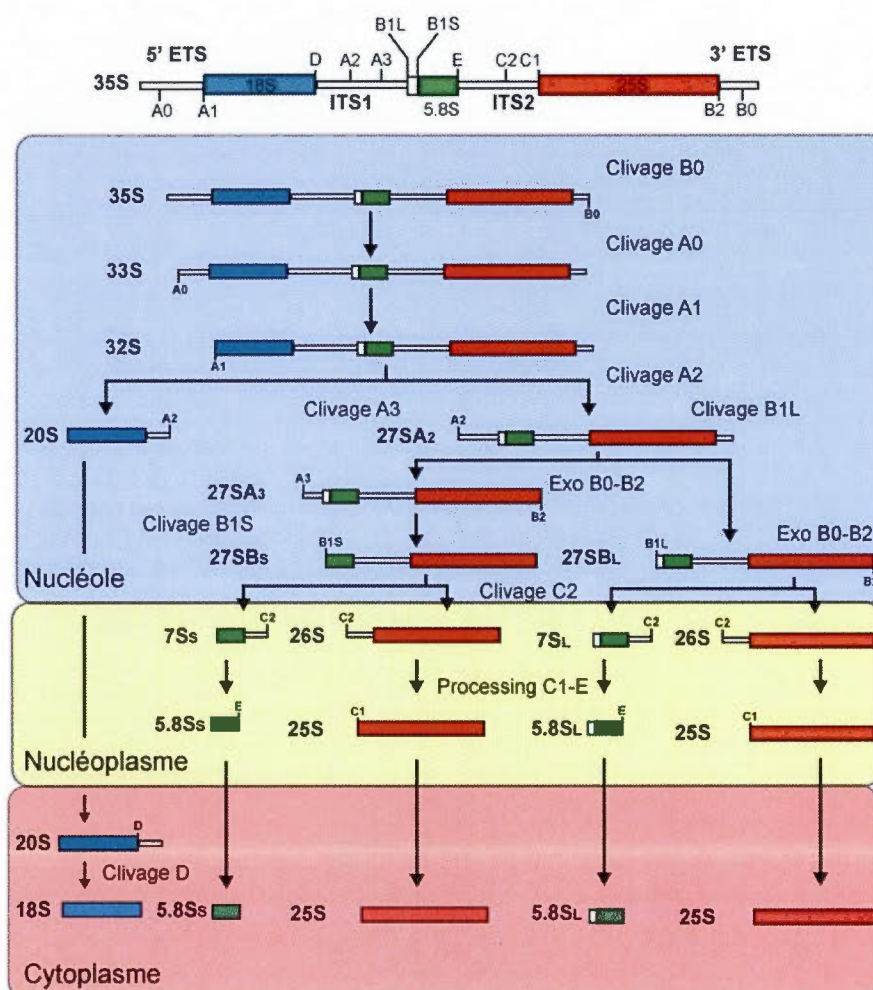


Figure 1.7 : Maturation du pré-ARNr chez *S. cerevisiae*. La structure de l'unité d'ADNr est présentée en haut. La voie de maturation du pré-ARNr est présentée en bas dans les rectangles colorés représentant les compartiments cellulaires dans lesquels la maturation des ARNr se déroule. Le pré-ARNr 35S est sujet à des modifications post-transcriptionnelles par les snoRNP C/D et H/ACA tout au long de sa transcription. Différents clivages co-transcriptionnels permettront l'élimination des régions espaceur (5'ETS, 3'ETS ITS1 et ITS2). Le clivage au site A2 sépare les voies menant d'une part, à la biogenèse de la petite sous-unité d'ARNr (18S) et, d'autre part, de la grande sous-unité d'ARNr (5.8S et 25S).

former une particule plus grosse appelée le SSU processome (Dragon *et al.*, 2002 ; Osheim *et al.*, 2004). L'assemblage du SSU processome se fait de façon modulaire, étape par étape, avec l'incorporation des sous-complexes t-UTP/UTPA, UTP-B, la snoRNP U3, UTP-C, Mpp10/Imp3/Imp4 et Bms1/Rcl1 (Figure 1.8; Perez-Fernandez, Martin-Marcos et Dosil, 2011 ; Phipps, Charette et Baserga, 2011). L'association de t-UTP avec le transcrit d'ARNr nouvellement synthétisé va initier la formation du SSU processome et est nécessaire pour le recrutement des autres composantes du SSU processome. Par la suite, deux autres sous-complexes vont s'associer au t-UTP de manière indépendante. D'une part, la snoRNP U3 et le sous-complexe UTP-B vont se lier et permettre l'association de Bms1. L'assemblage de Bms1 dans le SSU processome va permettre le recrutement de plusieurs autres facteurs protéiques dont le sous-complexe Mpp10. D'autre part, il y aura association de la protéine Rrp5 qui permettra en une seconde étape d'assemblage de recruter le sous-complexe UTP-C.

Dans des cellules en croissance, le SSU processome va s'assembler presque immédiatement après la transcription de l'ARNr 18S, quand l'ARN polymérase I a atteint presque le tiers de l'unité de transcription de l'ADNr. Lorsque la polymérase a atteint environ les deux-tiers du gène de l'ADNr, il y a clivage co-transcriptionnel au site A2, libérant ainsi le SSU processome (Osheim *et al.*, 2004). Après les clivages aux sites A0, A1 et A2, la plupart des facteurs non-ribosomiques se dissocient du complexe pré-40S et quelques autres facteurs requis pour la biogenèse du 40S ainsi que certaines autres protéines ribosomiques sont recrutés (Schafer *et al.*, 2003). Par la suite, il peut y avoir formation d'une autre grande particule (LSU processome) à l'extrémité 5' du transcrit restant (Osheim *et al.*, 2004). Dans des cellules en phase stationnaires ou lorsque les conditions de croissances sont moins favorables, le pré-ARNr est clivé une fois la transcription terminée (Kos et Tollervey, 2010 ; Osheim *et al.*, 2004).

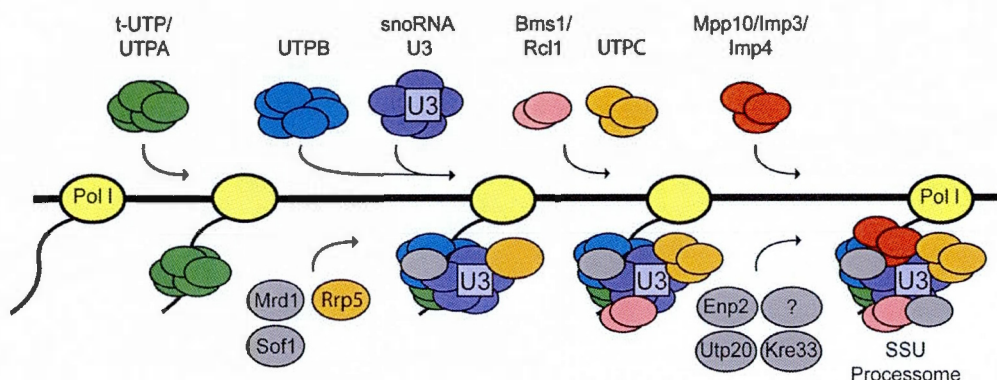


Figure 1.8 : Schéma d'assemblage du SSU processome. Tôt après le début de la transcription de l'ADNr par l'ARN polymérase I (Pol I), le sous-complexe t-UTP/UTPA va initier la formation du SSU processome. Par la suite, on trouve deux étapes primaires d'assemblage qui sont indépendantes l'une de l'autre. La première implique le sous-complexe UTPB et le snoRNA U3 qui permettra l'incorporation de Bms1. La seconde étape nécessite la liaison de Rrp5 qui est requise pour l'incorporation subséquente du complexe UTPC. Les protéines Mrd1 et Sof1 sont probablement recrutées au SSU processome lors de ces étapes primaires. Le sous-complexe Bms1/Rcl1 est requis pour une étape secondaire d'assemblage et va permettre l'assemblage de plusieurs protéines dont Utp20, Enp2, Kre33 et le sous-complexe Mpp10/Imp3/Imp4. Plusieurs autres protéines sont nécessaires à l'assemblage du SSU processome mais leur ordre d'assemblage n'est pas encore connu (représentées par ?).

1.1.9 La petite ribonucléoprotéine nucléolaire snR30

Le snoRNA snR30 est un membre de la famille des snoRNA H/ACA conservé au cours de l'évolution. En plus de *S. cerevisiae*, des homologues ont été retrouvés chez l'humain (U17), la tortue *Caretta caretta*, la grenouille *Xenopus laevis*, le poisson *Fugu rubripes*, la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, et l'amibe *Tetrahymena thermophila* (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004). Ses 608

nucléotides font de lui le deuxième plus long snoRNA de cette famille (Bally, Hughes et Cesareni, 1988 ; Torchet *et al.*, 2005). Il a été démontré qu'il possède les boîtes H et ACA et adopte la structure secondaire typique des H/ACA (Figure 1.9; Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004). Cet ARN est exprimé à partir d'un gène indépendant, il possède une coiffe triméthyl-guanosine (TMG) à son extrémité 5' (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004) et il est associé aux quatre protéines communes aux H/ACA (Henras *et al.*, 1998 ; Lübben *et al.*, 1995 ; Watkins *et al.*, 1998). SnR30 est codé par un gène essentiel; il est nécessaire aux clivages aux sites A0, A1 et A2 menant à la production de l'ARNr 18S de la petite sous-unité du ribosome (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004 ; Morrissey et Tollervy, 1993). Par contre, snR30 n'a aucune cible connue pour la pseudouridylation. SnR30 possède aussi deux motifs qui lui sont spécifiques et présents dans ses homologues, soit les motifs m1 (AUCCUAUA) et m2 (AAACCAU; Figure 1.9). Des mutations dans ces motifs montrent qu'ils sont essentiels à la production du 18S mais n'influencent pas l'accumulation de snR30. Les motifs m1 et m2 peuvent s'apparier avec des séquences cibles, nommées rm1 et rm2 situées dans l'extension ES6, une séquence d'ARNr spécifique aux eucaryotes retrouvée dans le domaine central de l'ARNr 18S (Figure 1.10 ; Fayet-Lebaron *et al.*, 2009 ; Taylor *et al.*, 2009). De plus, des éléments additionnels essentiels à la production de l'ARNr 18S ont été identifiés dans la portion distale de la tige-boucle 3' de l'ARN snR30, ce qui suggère que ces éléments pourraient être des sites de liaison pour des protéines qui seraient spécifiques à snR30 (Fayet-Lebaron *et al.*, 2009).

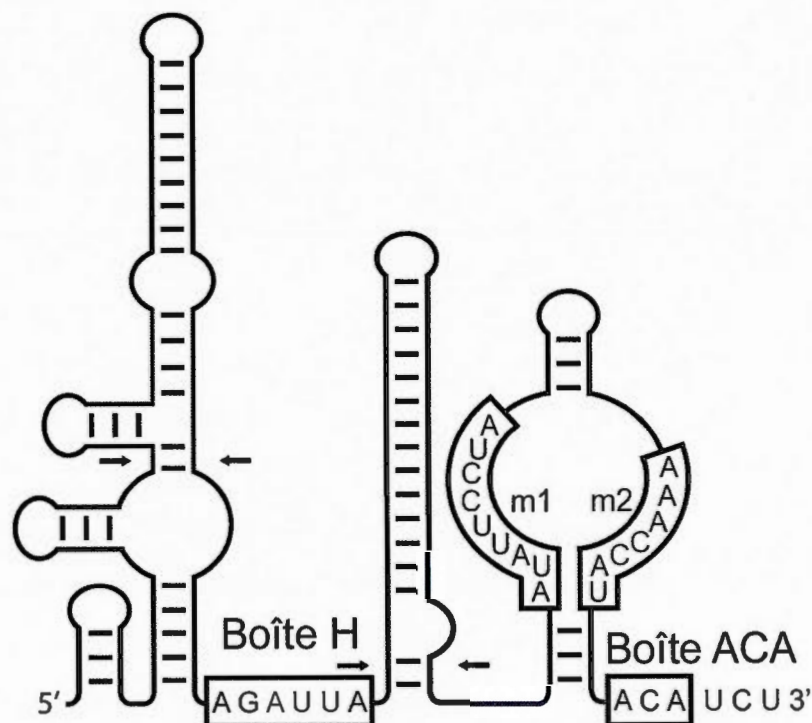


Figure 1.9 : Schéma de la structure secondaire de snR30. Le snoRNA snR30 adopte une structure secondaire typique des snoRNA de la famille H/ACA : snR30 possède une première tige-boucle, suivie d'une boîte H dans la portion charnière, une seconde tige-boucle et une boîte ACA située trois nucléotides en amont de l'extrémité 3'. Certains snoRNA H/ACA possèdent des tiges boucles additionnelles appelées éléments d'insertions ou tige-boucle interne (indiquées par des flèches). Les motifs m1 et m2 situées dans la tige-boucle 3' de snR30 sont identifiés.

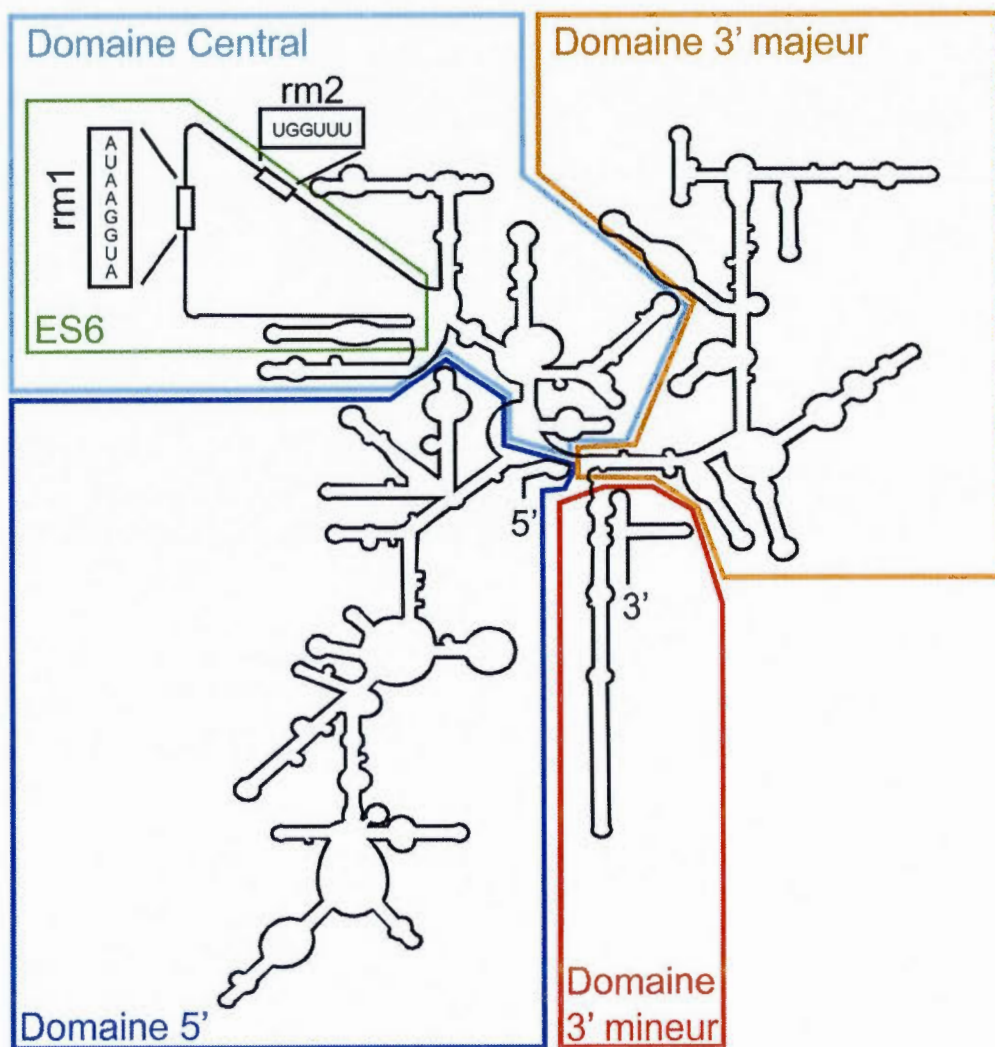


Figure 1.10 : Site d'appariement de snR30 à l'ARNr 18S. Un schéma de la structure secondaire de l'ARNr 18S de levure est présenté. Les domaines de l'ARNr 18S sont séparés par des lignes de couleurs. L'extension spécifique aux eucaryotes ES6 où snR30 s'apparie est identifiée en vert. Les séquences cible rm1 et rm2 sont indiquées et leurs séquences respectives sont encadrées.

La snoRNP snR30 a été purifiée une première fois par le groupe de Lührmann (Lübben *et al.*, 1995). Ils ont effectué une immunoprécipitation avec un anticorps anti-TMG pour enrichir les échantillons en RNP avec une coiffe TMG suivi d'une déplétion de la RNP nucléaire (snRNP) U1 par une chromatographie échangeuse d'ions Mono Q. Ils ont trouvé sept protéines associées à snR30 ayant des masses apparentes de 65, 48, 46, 38, 25, 23, 10 kDa, dont les quatre protéines H/ACA. Les auteurs n'ont pas pu identifier clairement des protéines associées à snR30. Lors d'une seconde tentative, le groupe de Lührmann a utilisé la même approche pour identifier des protéines associées à snR30 par spectrométrie de masse (Watkins *et al.*, 1998); ils ont identifié les quatre protéines H/ACA ainsi que des protéines Sm (protéines impliquées dans l'épissage) mais aucune protéine spécifique à snR30. Une étude plus récente par le groupe de Fournier (Liang et Fournier, 2006) a montré que snR30 est associée à Has1, une ARN hélicase de la famille « DEAD-box ». Pour purifier la snoRNP snR30, ce groupe a inséré la séquence de la tige-boucle II du snRNA U1 dans le snoRNA snR30. Cette construction a été exprimée dans une souche où la protéine UA1 d'origine humaine, qui se lie spécifiquement à la tige-boucle II du snRNA U1, est exprimée en fusion avec un épitope HA. Cependant, la protéine Has1 n'est pas spécifique à snR30 puisque les auteurs ont démontré une forte association de Has1 avec les snoRNA U3, U14 et snR63 ainsi qu'avec les snRNA U1 et U6 (Liang et Fournier, 2006). Une association possible entre snR30 et l'ARN hélicase de la famille DEAD-box Rok1 a été notée puisque cette protéine est requise de façon spécifique pour dissocier snR30 des pré-ribosomes (Bohnsack, Kos et Tollervey, 2008). Récemment, le groupe de Kiss a purifié snR30 en utilisant un «tag» d'ARN composé d'une séquence reconnue par la tobramycine et trois motifs reconnus par la protéine de la capsid du bactériophage MS2. Ils ont montré une association spécifique de snR30 avec les protéines Utp23 et Kri1 (Hoareau-Aveilla *et al.*, 2012).

1.1.10 Ribosomopathies

Il existe plusieurs maladies reliées aux ribosomes, communément appelées ribosomopathies. Voici une brève description des plus importantes identifiées à ce jour. Pour une revue de littérature plus détaillée, vous pouvez consulter Freed *et al.* (2010).

L'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) est une maladie héréditaire de la moelle osseuse caractérisée par une hématopoïèse proapoptotique, une défaillance de la moelle osseuse, des malformations à la naissance et une prédisposition aux cancers. De plus, 40% des patients présentent aussi des malformations cranio-faciales, cardiaques, des membres et urogénitales. Tous les gènes mutés impliqués dans cette maladie sont des gènes encodant des protéines ribosomiques. Des mutations ont été identifiées dans des protéines ribosomiques de la petite sous-unité ainsi que de la grande sous-unité : *RPS7*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A* et possiblement *RPS15*, *RPS27A*, et *RPL36*. Le gène le plus souvent muté chez les patients atteints de DBA est *RPS19*. Cependant, des mutations dans le gène *RPL5* sont associées à des symptômes plus sévères. Le type de mutations retrouvées dans *RPS19* inclut des mutations non-sens et faux-sens, de petites insertions et délétions, des défauts aux sites d'épissage, de grandes délétions et des réarrangements.

Le syndrome de Treacher Collins est une maladie autosomique dominante qui provoque des anomalies au niveau des oreilles, des yeux et des os de la figure, particulièrement au niveau de la mâchoire et des joues. Les mutations observées chez les patients atteints de cette maladie se retrouvent dans le gène *TCOF1* qui encode la protéine Treacle et toutes les mutations donnent une forme tronquée de la protéine. Treacle est une phosphoprotéine nucléolaire impliquée dans la transcription de l'ARNr et dans la méthylation de l'ARNr 18S. Treacle est requise pour la formation et la prolifération des cellules de la crête neurale. Tous les patients atteints du syndrome de Treacher Collins sont hétérozygotes pour les mutations dans *TCOF1*, ce

qui semble indiquer que la maladie est due à une haploinsuffisance plutôt qu'à un effet dominant négatif. De plus, un modèle de souris knock-out pour *Tcof* indique que les souris homozygotes sont non-viables tandis que des souris hétérozygotes meurent 24 heures après la naissance.

La dyskératose congénitale (DC) est une maladie génétique dont les patients peuvent présenter des anomalies cutanéomuqueuses, une prédisposition pour plusieurs cancers et des défaillances de la moelle osseuse. Dans les cas plus sévères, la maladie peut être associée à une immunodéficience, un retard de croissance ainsi que des symptômes neurologiques. La DC peut être une maladie récessive liée à l'*X* ou encore autosomique dominante ou récessive. La forme liée à l'*X* est causée par des mutations dans le gène codant pour la dyskérine, la pseudouridine syntase des snoRNP H/ACA. La forme autosomique récessive est causée par des mutations dans l'une ou l'autre des protéines H/ACA NHP2 et NOP10 ou dans *TERT* (le gène encodant la transcriptase inverse de la RNP télomérase) et la forme autosomique dominante par des mutations l'ARN de la télomérase ou *TERT*.

Le syndrome de Prader-Willi est une maladie caractérisée par une hypotonie musculaire à la naissance, une petite stature, de l'hyperphagie et de l'obésité, de l'hypogonadisme et des caractéristiques faciales particulières telles une bouche éversée et un diamètre frontal étroit. Les mutations responsables de cette maladie se retrouvent dans la région chromosomique 15q11-q13 qui encode plusieurs snoRNA de la famille C/D dont les cibles sont pour la plupart inconnues à l'exception du snoRNA HBII-52. Ce snoRNA changerait l'épissage alternatif du pré-ARNm du récepteur à sérotonine 2C (Kishore *et al.*, 2010).

Plus près de nous, la cirrhose amérindienne infantile est une maladie autosomique récessive qui touche la population autochtone Ojibway-Cree du Québec.

Cette maladie progresse de la jaunisse chez les nouveau-nés jusqu'à une cirrhose biliaire et le seul traitement possible est une transplantation du foie. Cette maladie est causée par une mutation R565W dans la protéine Cirhin/UTP4 qui est une composante du SSU processome.

Il existe plusieurs autres maladies où l'on retrouve des mutations dans des gènes reliées aux ribosomes ou à leur maturation. Parmi celles qui n'ont pas été décrites plus haut, on retrouve le syndrome de Bowen-Conradi (retards de croissance, délais psychomoteurs, microcéphalie et malformations des articulations), le syndrome ANE (perte de cheveux, retards mentaux, perte des habiletés moteur, hypogonadisme, insuffisance surrénalienne, petite stature, microcéphalie et anomalies sévères de la peau et du squelette), le syndrome de Shwachman-Bodian (prédisposition à la leucémie, insuffisance pancréatique, anomalies hématologiques, squelettiques et endocrinologiques), le syndrome de 5q- (problèmes de différenciation des cellules érythroïdes qui peut mener à des leucémies myéloïdes aigues), des glaucomes à angle ouvert, des neurofibromatoses de type I (NF1), et finalement des dysplasies du squelette (Freed *et al.*, 2010).

Même si le lien entre la biogenèse des ribosomes et le cancer n'est pas bien compris, plusieurs indices indiquent qu'un problème au niveau de la maturation et la production de ribosomes pourrait mener au cancer. Tout d'abord, la biogenèse des ribosomes et la structure nucléaire sont altérées pour répondre aux besoins des cellules cancéreuses. La taille, la forme et le nombre de nucléoles sont souvent utilisés pour diagnostiquer un cancer. La dérégulation de la biogenèse des ribosomes altère le cycle cellulaire, la croissance et la prolifération des cellules. Il est aussi connu que certaines protéines ribosomiques peuvent réguler l'oncogène c-MYC et le suppresseur de tumeurs p53 qui peuvent, à leur tour, réguler la synthèse de ribosomes.

1.2 HYPOTHÈSES

La snoRNP snR30 possède tous les éléments nécessaires pour effectuer la pseudouridylation, mais elle n'a pas de cible connue pour cette modification; snR30 est plutôt impliquée dans des réactions de clivage menant à la formation de l'ARNr 18S de la petite sous-unité ribosomique. Cependant, comment snR30 participe aux clivages aux sites A0, A1 et A2 reste encore à être élucidé. L'ARN snR30 pourrait être un ARN catalytique qui, une fois intégré au SSU processome, peut cliver le pré-ARNr 35S aux sites A0, A1 et A2 par lui-même ou en coordination avec d'autres molécules du SSU processome. Il est aussi possible que snR30 soit associé à des protéines qui lui sont spécifiques et qui lui confèrent sa fonction unique. Dans cette perspective, la snoRNP snR30 pourrait être une chaperonne qui permet le recrutement au SSU processome de protéines nécessaires aux clivages A0, A1 et A2 ou à son assemblage. Finalement, snR30 et ces protéines associées pourraient induire des changements de conformation au pré-ARNr 35S qui rendent accessibles les sites de clivages A0, A1 et A2 aux molécules responsables de ces clivages.

Notre hypothèse de départ est que snR30 est associé à des protéines qui lui confèrent sa fonction unique. Premièrement, il est rare de retrouver dans une cellule de l'ARN « nu » car ce dernier est plus susceptible d'être dégradé. Avec sa grande taille (608 nucléotides), il est peu probable que snR30 ne soit associé qu'à quatre protéines H/ACA, même si ces dernières peuvent se retrouver en deux exemplaires, soit un exemplaire de chaque protéine par tige boucle. De plus, il est possible de faire un parallèle entre snR30 et U3, une snoRNP de la famille C/D. Les snoRNA de cette famille sont aussi associés à quatre protéines communes à toutes les snoRNP C/D. Les snoRNP à boîtes C/D sont impliquées dans des modifications post-transcriptionnelles de méthylation sur le pré-ARNr 35S. Comme snR30, U3 n'est pas impliquée dans des modifications post-transcriptionnelles mais plutôt dans les réactions de clivage qui permettent la production d'ARNr 18S. De plus, U3 est aussi le plus gros ARN de sa famille. Dans le cas de U3, il a été démontré que ce snoRNA

est associé à pas moins de 40 protéines qui lui sont spécifiques et qui lui confèrent probablement sa fonction unique (Bernstein *et al.*, 2004 ; Dragon *et al.*, 2002 ; Gallagher *et al.*, 2004). Il est possible que snR30 possède lui aussi des protéines qui lui sont spécifiques et qui lui confèrent ces propriétés uniques.

1.3 OBJECTIFS

Le premier objectif de cette thèse était de purifier la snoRNP snR30 et d'identifier son contenu protéique. Par la suite, nous avons voulu caractériser ces protéines afin de déterminer leur(s) rôle(s) lorsqu'elles sont associées à snR30. Finalement, nous voulons préciser le rôle de snR30 dans la maturation de l'ARNr et la formation du SSU processome. Connaître les composantes protéiques de snR30 approfondirait nos connaissances sur sa biogenèse et sa fonction au sein de la maturation du pré-ARNr 35S et des ribosomes. Mieux saisir la fonction de snR30 et connaître ses partenaires d'interaction nous permettrait d'élaborer une carte du SSU processome ou un ordre d'assemblage plus détaillé de ce dernier.

Notre deuxième objectif a été de caractériser deux protéines associées à snR30, soit Nop6 et Rps18. La protéine Nop6 nous a intéressés puisqu'elle possède possiblement un domaine de liaison à l'ARN de type RRM et des domaines « coiled-coil » qui sont généralement impliqués dans des interactions protéines-protéines. De plus, Nop6 localise au nucléole (Huh *et al.*, 2003), elle a déjà été purifiée avec des protéines H/ACA (Ho *et al.*, 2002 ; Krogan *et al.*, 2006 ; Krogan *et al.*, 2004) et elle est impliquée dans la biogenèse de la petite sous-unité 40S (Garcia-Gomez *et al.*, 2011). Nous avons donc voulu étudier le rôle spécifique de Nop6 dans la biogenèse des ARNr et le lien que cette protéine peut avoir avec snR30. Chez *S. cerevisiae*, la protéine ribosomique Rps18 est exprimée à partir de deux gènes dupliqués codant pour deux protéines dont la séquence en acides aminés est identique. Il a été démontré que certaines protéines ribosomiques ont des rôles « extraribosomiques », c'est-à-dire qu'en plus d'être des constituants du ribosome, elles ont d'autres fonctions cellulaires

telles que dans la transcription, l'épissage, la traduction, ou la maturation d'ARNr (Warner et McIntosh, 2009 ; Wool, 1996). De plus, les travaux de Komili *et al.* (2007) suggèrent que les paralogues de protéines ribosomiques pourraient avoir des rôles spécifiques. Nous pensons que Rps18A et Rps18B pourraient non seulement avoir un rôle dans le ribosome mais aussi dans la biogenèse des ARNr lorsqu'elles sont associées à différentes snoRNP. Une analyse approfondie du rôle des protéines Nop6 et Rps18 nous permettrait non seulement de comprendre le mode de fonctionnement de snR30 mais aussi d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme de maturation des ARNr.

1.4 MÉTODOLOGIE GÉNÉRALE

Afin d'identifier les protéines associées à snR30, nous avons développé un système pour purifier la snoRNP snR30 par chromatographie d'affinité. Nous avons introduit un « tag » d'ARN dans l'ARN de snR30, la seule composante unique de la RNP, afin d'isoler snR30 de façon spécifique et identifier son contenu protéique par spectrométrie de masse. L'association entre les protéines identifiées et snR30 a été validée par des expériences d'immunoprécipitations. Pour étudier la fonction de snR30, nous avons effectué des analyses par extension d'amorces et des observations d'étalements de chromatine par microscopie électronique. En parallèle, nous avons effectué des analyses par microscopie à fluorescence et par gradient de sucrose afin de préciser le rôle de Nop6 dans la maturation des ARNr.

Dans le but de caractériser la fonction des protéines Rps18A et Rps18B et déterminer si elles sont impliquées dans la maturation des ARNr, nous avons généré des souches de levures modifiées où l'expression de Rps18A ou Rps18B est altérée. Nous avons ensuite analysé le rôle de Rps18A ou Rps18B dans la croissance cellulaire et la maturation des ARNr. Une étude des gènes *RPS18A* et *RPS18B* et de leurs ARNm par RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) et par analyses

bioinformatiques a été effectuée afin d'expliquer les différences d'expression observées entre Rps18A et Rps18B.

CHAPITRE II

IDENTIFICATION DE NOUVELLES PROTÉINES ASSOCIÉES AU PETIT ARN NUCLÉOLAIRE snR30

2.1 AVANT PROPOS

Afin de répondre à notre hypothèse de départ, à savoir si snR30 est associé à des protéines spécifiques qui pourraient contribuer à sa fonction unique, j'ai mis au point un système de purification afin d'isoler spécifiquement la snoRNP snR30 et identifier son contenu protéique. Nous avons montré une association entre snR30 et la protéine nucléolaire Nop6, les protéines ribosomiques S9 et S18, ainsi que les histones H2B et H4. De plus, des analyses supplémentaires nous ont permis de mieux définir la fonction de snR30 dans la maturation des ARNr. Par des analyses de microscopie électronique, nous avons déterminé que snR30 est requis pour l'assemblage du SSU processome. Nous avons aussi démontré par la méthode d'extension d'amorces que snR30 est nécessaire pour les clivages aux sites A0, A1 et A2.

J'ai effectué la majeure partie des travaux présentés, dont l'exécution des expériences de laboratoire, la rédaction de l'article et la conception des tableaux et figures, sous la supervision du Dr François Dragon. J'ai aussi participé à la conception expérimentale. Ahmed Hossain a fait les images de microscopie à fluorescence et Yvonne Osheim et Ann Beyer ont fait les travaux de microscopie électronique. Ces travaux ont été publiés dans *Nucleic Acids Research*. 2011, vol. 39, no 22, p. 9659-9670.

Identification of novel proteins associated with yeast snR30 small nucleolar RNA

Vincent Lemay¹, Ahmed Hossain¹, Yvonne N. Osheim², Ann L. Beyer², and François Dragon^{1,3}

¹ Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

² Department of Microbiology, University of Virginia Health System, Charlottesville VA 22908-0734, U.S.A.

³ Corresponding author: dragon.francois@uqam.ca

2.2 ABSTRACT

H/ACA small nucleolar RNPs (snoRNPs) that guide pseudouridylation reactions are constituted of one small nucleolar RNA (snoRNA) and four common proteins (Cbf5, Gar1, Nhp2 and Nop10). Unlike other H/ACA snoRNPs, snR30 is essential for the early processing reactions that lead to the production of 18S ribosomal RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To determine whether snR30 RNP contains specific proteins that contribute to its unique functional properties, we devised an affinity purification strategy using TAP-tagged Gar1 and an RNA aptamer inserted in snR30 snoRNA to selectively purify the RNP. Northern blotting and pCp labeling experiments showed that S1-tagged snR30 snoRNA can be selectively purified with streptavidin beads. Protein analysis revealed that aptamer-tagged snR30 RNA was associated with the four H/ACA proteins and a number of additional proteins: Nop6, ribosomal proteins S9 and S18, and histones H2B and H4. Using antibodies raised against Nop6, we show that endogenous Nop6 localizes to the nucleolus and that it cosediments with snR30 snoRNA in sucrose density gradients. Electron microscopy analyses of chromatin spreads from cells depleted of snR30 snoRNA show that it is required for SSU processome assembly. Finally, we demonstrate through primer extension experiments that snR30 snoRNA is required for cleavages at site A0, A1 and A2, and that the absence of Nop6 decreases the efficiency of cleavage at site A2.

2.3 INTRODUCTION

Eukaryotic ribosome biogenesis takes place in the nucleolus, a prominent compartment of the nucleus. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this process requires around 200 proteins and different small nucleolar RNAs (snoRNAs) to produce functional ribosomes (Kressler, Hurt et Bassler, 2010). In order to function, snoRNAs associate with specific proteins to form ribonucleoproteins [snoRNPs; (Reichow *et al.*, 2007)]. In *S. cerevisiae*, there are 47 snoRNAs belonging to the box C/D family, and 29 snoRNAs of the box H/ACA class; RRP2, the RNA subunit of RNase MRP, is the sole member of its own family (Piekna-Przybylska, Decatur et Fournier, 2007).

H/ACA snoRNAs act as guides for site-specific pseudouridylation (Ganot, Bortolin et Kiss, 1997 ; Ni, Tien et Fournier, 1997). They adopt a hairpin-hinge-hairpin-tail structure where box H (ANANNA) is located in the hinge region and box ACA in the tail region, always three nucleotides upstream of the 3' end (Balakin, Smith et Fournier, 1996 ; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss, 1997). Boxes H and ACA are important for snoRNA stability and accumulation (Balakin, Smith et Fournier, 1996 ; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss, 1997). The hairpins are generally interrupted by an internal loop, called the pseudouridylation pocket, which contains short sequences complementary to the target RNA that undergoes uridine to pseudouridine (Ψ) isomerization. Box H/ACA snoRNAs also share four common proteins: Cbf5 (named dyskerin in humans), Gar1, Nhp2 and Nop10 (Reichow *et al.*, 2007). Cbf5 is the enzyme responsible for the U to Ψ isomerization [(Reichow *et al.*, 2007) and references therein]. Gar1 is a late assembly protein and it is found only in mature snoRNPs (Darzacq *et al.*, 2006).

Very few snoRNAs are required for the cleavage reactions that remove spacer sequences of pre-ribosomal RNAs (pre-rRNAs). In yeast, box C/D snoRNAs U3 and

U14, and box H/ACA snoRNA snR30 are essential for 18S rRNA synthesis (Venema et Tollervy, 1999). RNase MRP is involved in cleavage at site A3, upstream of 5.8S rRNA (Lygerou *et al.*, 1996). Processing complexes form co-transcriptionally and can be visualized by electron microscopy (EM) carried out on chromatin spreads of rRNA genes: these complexes appear as granules (or “terminal knobs”) at the 5’ end of nascent rRNA transcripts, forming the so-called “Christmas trees”. Terminal knob formation and subsequent processing require the U3 snoRNA and all of its associated proteins; the U3 complex binds nascent pre-rRNA to form a small 5’-ETS particle that condenses with pre-rRNA and additional factors to form a larger knob coined the SSU processome (Dragon *et al.*, 2002 ; Osheim *et al.*, 2004). In exponentially growing cells, SSU processomes assemble on nascent transcripts almost immediately after transcription of the 18S rRNA, when polymerases have reached just beyond one-third of the rDNA gene. At about two-thirds of the rDNA gene, cleavage at site A2 releases the SSU processome (pre-40S ribosome). There may be subsequent formation of a large subunit knob (LSU processome) at the 5’ end of the remaining transcript (Osheim *et al.*, 2004). In post-logarithmic cells or less favorable conditions, these processing steps are post-transcriptional (Kos et Tollervy, 2010 ; Osheim *et al.*, 2004).

The snR30 snoRNA is highly conserved from yeast to humans (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004). According to secondary structure analyses, snR30 RNA adopts a hairpin-hinge-hairpin-tail structure, and bears the conserved H and ACA motifs [(Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004); see Figure 2.1A]. Although snR30 snoRNA is associated with the four H/ACA proteins (Henras *et al.*, 1998 ; Lübben *et al.*, 1995 ; Watkins *et al.*, 1998), it has no known target for pseudouridylation (Ganot, Bortolin et Kiss, 1997 ; Ni, Tien et Fournier, 1997). However, snR30 snoRNA is essential for the early cleavage steps at sites A0, A1 and A2 that lead to the production of the 18S rRNA of the small ribosomal subunit (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004 ; Morrissey et Tollervy, 1993). Two motifs identified in the 3’ hairpin of snR30 RNA and its orthologs are important for function (motifs m1 and m2; Figure

2.1A); mutations in these motifs impair 18S production without affecting snR30 snoRNA accumulation (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004). Motifs m1 and m2 base-pair with target sequences rm1 and rm2 in ES6, a eukaryote-specific rRNA sequence found in the central domain of the 18S rRNA (Fayet-Lebaron *et al.*, 2009 ; Taylor *et al.*, 2009). Moreover, additional elements that are essential for 18S rRNA processing were identified in the distal part of the 3' terminal hairpin of snR30 RNA, suggesting that these elements could be docking site(s) for putative snR30-specific proteins (Fayet-Lebaron *et al.*, 2009).

In this study, we devised an affinity chromatography procedure to purify snR30 snoRNP. We show that snR30 snoRNA is associated with the four H/ACA proteins and a number of additional proteins. We also show that absence of snR30 snoRNA impairs SSU processome assembly and abolishes cleavage at sites A0, A1 and A2. Finally, we confirm that endogenous Nop6 localizes to the nucleolus and that a deletion of Nop6 reduces the efficiency of cleavage at site A2.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Generation of the S1-snR30 construct.

The whole *SNR30* locus, including promoter and terminator sequences [~1.5 kbp; (Bally, Hughes et Cesareni, 1988)], was PCR-amplified from yeast genomic DNA and cloned in pBluescript II SK(-). The minimal S1 aptamer (Srisawat et Engelke, 2001) was introduced in the snR30 sequence between nucleotides 234-238 (thus deleting residues 235-237) using the overlap extension method of site-directed mutagenesis (Higuchi, Krummel et Saiki, 1988). The *SNR30* and *S1-SNR30* fragments were cloned in the yeast vector pRS316 (Sikorski et Hieter, 1989), to generate plasmids pRS316-SNR30 and pRS316-S1-SNR30, respectively.

2.4.2 Yeast strains and media.

Yeast strains are described in Table 2.1. The strains were grown in rich medium, YPD or YPGal (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose or 2% galactose, respectively). When required, strains were grown in SD or SGal (0.67% yeast nitrogen base, 2% dextrose or 2% galactose, respectively) complemented with the appropriate dropout mix. Yeast transformation was carried out as described (Gietz *et al.*, 1992). Strain GAR1-TAP expressing TAP-tagged Gar1 under the control of its natural promoter was generated as described (Rigaut *et al.*, 1999). Strains YPH499 and GAR1-TAP were modified to express snR30 snoRNA under the control of the GAL1 promoter (Longtine *et al.*, 1998); the resulting strains were named GAL::SNR30 and GAL::SNR30T, respectively.

2.4.3 Spot assays and growth curves.

Strains YPH499, GAL::SNR30T, GAL::SNR30V, WT-SNR30 and S1-SNR30 were grown in galactose-containing medium to exponential phase ($A_{600} \approx 0.5$), harvested, washed and resuspended in sterile water to an OD of 1. Ten-fold

serial dilutions of these cell suspensions were spotted onto YPD or YPGal plates that were incubated at 16°C, 30°C or 37°C. For cultures in liquid media, GAR1-TAP, GAL::SNR30T and S1-SNR30 strains were grown in galactose-containing medium to exponential phase, harvested, washed and resuspended to an OD of 0.1 in YPD pre-warmed at 30°C. During growth in YPD, strains were kept in exponential growth ($A_{600} < 0.7$) by dilution in pre-warmed YPD. For depletion experiments, strains were grown as described above and harvested by centrifugation 9 h or 12 h after the shift to YPD.

2.4.4 Affinity purification of S1-snr30.

Cells expressing S1-tagged snR30 snoRNA were grown in YPD to exponential phase ($A_{600} \approx 0.5$) and harvested by centrifugation. The cell pellet was washed twice in ice-cold sterile water and resuspended in TMK150 buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl, 1 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 0.1% NP-40] complemented with Complete protease inhibitor (Roche). The buffer to cell ratio was 10 μ l/ A_{600} unit. Cells were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Frozen cells were thawed on ice and whole cell extract was prepared using 400-625 micron glass beads (Sigma). The lysate was cleared by centrifugation (5 min, 10000 x g). The cell extract (40 ml) was split into eight tubes and each was incubated with 200 μ l of IgG-agarose beads (GE Healthcare) at 4°C for 2 h on a nutator. Beads were placed in eight poly-prep columns (Bio-Rad) and each was washed with 25 ml of TMK150 lacking NP-40 and DTT. Elution from IgG beads was carried out with 1 ml of TMK150-TEV [TMK150 with 100 units of AcTEV protease (Invitrogen) and 60 μ g/ml of avidin (Sigma)] for 2 h at 16°C on a nutator. Eluates were pooled and incubated with 400 μ l of streptavidin-agarose beads (Sigma) at 4°C for 1 h on a nutator. Streptavidin beads were placed in a poly-prep column, washed with 50 ml of TMK150 and incubated with 800 μ l of TMK150 supplemented with 5mM biotin (Sigma) to elute the S1-snr30 complex. Eluates were split in four

samples, two for RNA analyses (3' end pCp labeling and northern hybridization) and two for protein analyses (western blotting and silver staining).

2.4.5 RNA analyses.

RNAs were recovered by phenol extraction and ethanol precipitation, and labeled at their 3' end as described (Dragon, Pogacic et Filipowicz, 2000). Identification of RNAs was done by northern hybridization with radiolabelled probes as described (Dragon *et al.*, 2002). Primer extension analyses were done as described (Venema, Planta et Raué, 1998) with probes A0-A1, 18S and A2-A3. Samples were separated on an 8% sequencing gel and the gel was dried after electrophoresis. For the list of probes used for northern hybridization and primer extension see Table 2.2. Membranes and dried gels were exposed to a phosphor screen and revealed with the Molecular Imager F/XTM (Bio-Rad).

2.4.6 Production of anti-Cbf5 and anti-Nop6 antibodies.

The synthetic peptide KEYVPLDNAEQSTSC was used to raise anti-Cbf5 antibodies. Peptide synthesis and immunization were done by Invitrogen. To produce anti-Nop6 antibodies, rabbits were immunized in-house at the Animal Care Facility with recombinant Nop6: *NOP6* ORF was cloned into pGEX-4T-1 and GST-tagged Nop6 was produced in strain Rosetta II (DE3) pLysS (Novagen). GST-Nop6 was purified by affinity chromatography using GSTrapTM columns (GE Healthcare), and recombinant Nop6 was isolated after cleavage with thrombin following recommendations of the supplier. Western blot analyses showed that antibodies raised against Cbf5 and Nop6 specifically recognize proteins of 55 kDa and 25 kDa, respectively (data not shown). For immunofluorescence microscopy (see below), anti-Nop6 antibodies were purified by affinity chromatography with GST-Nop6 coupled to CNBr-activated Sepharose® 4B agarose beads (GE Healthcare).

2.4.7 Protein analyses.

Proteins were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels or Criterion Bis-Tris 4-12% gradient polyacrylamide gels (Bio-Rad). For western analysis, proteins were transferred onto PVDF membranes (Immobilon-P; Millipore), and immunodetection was carried out with anti-Cbf5 peptide antibodies diluted 1/2000, anti-Nhp2 antibodies (Henras *et al.*, 2001), anti-Nop6 antibodies diluted 1/1000 or PAP antibodies (Sigma). HRP-conjugated secondary antibodies were used according to manufacturer's recommendations (GE Healthcare). Blots were revealed with ECL PlusTM (GE Healthcare). Silver staining was carried out as described (Nesterenko, Tilley et Upton, 1994). Gel slices were analyzed by mass spectrometry (McGill University and Génome Québec Innovation Center, and SAMS Centre for Proteomics at the University of Calgary).

2.4.8 Validation of mass spectrometry results.

Whole cell extracts were prepared as described above except that 25 A₆₀₀ units of cells were resuspended in 2.5 ml TMK150 buffer. Extracts were pre-cleared by incubation with 50 µl of CL-4B agarose beads (Sigma) at 4°C for 30 min on a nutator. The RNA concentration of each extract was determined by spectrophotometry (A₂₅₄), normalized with TMK150, and 2 ml samples (≈ 8 A₂₅₄ units) were incubated with 50 µl of IgG-agarose beads at 4°C for 1 hr on a nutator. The beads were washed 6 times with 1 ml TMK150, resuspended in 100 µl elution buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1 U/µl RNasin®(Promega)] and incubated at 65 °C for 10 minutes with occasional mixing. RNAs were analyzed as described above.

2.4.9 Sucrose density gradients.

Extracts were fractionated on 7-47% linear sucrose gradients essentially as described (Kressler *et al.*, 1997) except that TMK150 buffer without heparin was

used. Sixteen fractions were collected from top to bottom with an ISCO density gradient fractionation system coupled to a UA-6 detector to produce continuous absorbance profiles at 254 nm. Absorbance profiles were used to locate 40S and 60S ribosomal subunits, 80S ribosomes and polysomes.

2.4.10 Immunofluorescence microscopy.

Yeast cells were processed essentially as described (Pringle *et al.*, 1989). Purified anti-Nop6 antibodies and mouse monoclonal anti-fibrillarin antibody 17C12, which recognizes the nucleolar marker fibrillarin and its yeast homologue Nop1 (Yang *et al.*, 2001), were diluted 1/500 in blocking buffer (0.5% BSA, 0.5% Tween 20 in PBS) and incubated overnight at 4°C. Secondary antibodies Alexa Fluor®488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor®555 goat anti-mouse IgG (Invitrogen) were diluted 1/1000 in blocking buffer and incubated for 30 min at room temperature. Nuclear DNA was stained for 15 min with 2 µg/ml of 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). Coverslips were washed with blocking buffer and slides were mounted with Prolong® Gold antifade reagent (Invitrogen). Specimens were observed with an Eclipse Ti inverted microscope (Nikon) with an apochromat objective (numerical aperture 1.4); images were acquired with a Monochrome CCD camera (CFW1312 from Scion Corporation) and processed with ImageJ V 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

2.4.11 Chromatin spreads and electron microscopy.

The GAL::SNR30 strain was used to carry out chromatin spreads essentially as described (Dragon *et al.*, 2002 ; Osheim *et al.*, 2004). Exponentially growing cells were shifted from YPGal to YPD medium and incubated for 5 h to deplete the snR30 snoRNA. Hundreds of rRNA genes were seen in chromatin spreads from both control and snR30-depleted cells, with representative examples shown in Figure 2.9. The experiment was repeated with similar results.

2.5 RESULTS

2.5.1 Affinity purification of snR30 snoRNP.

To selectively purify snR30 snoRNP by affinity chromatography and identify its protein components, we designed a two-step purification strategy to be used with a modified yeast strain. The TAP tag (Rigaut *et al.*, 1999) was fused to the C-terminus of the H/ACA protein Gar1 (strain GAR1-TAP). It is worth noting that we chose to tag Gar1 because this protein is found only in mature, functional H/ACA RNPs (Darzacq *et al.*, 2006). The TAP tag was used to recover the entire family of H/ACA snoRNPs. As there is no known snR30-specific protein that could be used to selectively isolate snR30 snoRNP from the pool of H/ACA snoRNPs, we introduced an RNA tag in snR30 snoRNA (Figure 2.1A). We used the minimal S1 aptamer, which has high affinity and specificity for streptavidin (Srisawat et Engelke, 2001).

Because snR30 snoRNA is essential for viability, sequence modifications that interfere with its function cause cell death (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004 ; Bally, Hughes et Cesareni, 1988). To test whether the introduction of the S1 aptamer in snR30 snoRNA interferes with its function, strain S1-SNR30 was first grown to logarithmic phase in galactose-containing medium to allow expression of both chromosomally-encoded snR30 and plasmid-borne S1-snR30, and then shifted to dextrose-containing medium to turn off the GAL1 promoter (Longtine *et al.*, 1998) and shut down expression of untagged snR30 snoRNA. In the absence of chromosomally-encoded snR30 snoRNA, these cells rely solely on plasmid-borne S1-snR30 snoRNA for survival. On YPD plates incubated at 30°C, strain S1-SNR30 grew as well as the wild-type strain YPH499 or the control strain WT-SNR30 expressing untagged snR30 snoRNA from a single-copy plasmid. This is in marked contrast with the GAL::SNR30T strain containing the empty vector pRS316 (Figure 2.1B). Strains were also incubated at 16°C and 37°C, and no difference in growth was observed (data not shown). We compared growth in liquid medium after shifting

strains from galactose- to dextrose-containing medium. The growth rate of strain GAL::SNR30T (without plasmid-borne snR30) began to slow down just around 5 hours after the shift to YPD, and growth was significantly impaired after 24 h of depletion (Figure 2.1C). In contrast, the strain expressing S1-snR30 snoRNA grew as well as strain GAR1-TAP in YPD (Figure 2.1C). These results demonstrate that S1-tagged snR30 is functional.

We used the S1-SNR30 strain grown in YPD for our affinity purification procedure. For affinity selection done in a single step, extracts were incubated with streptavidin-agarose beads to selectively isolate the snR30 complex. Single-step purification of S1-snR30 was compared with the immunoprecipitation (IP) of Gar1-TAP. After elution, the RNAs and proteins of the purified RNPs were recovered and analyzed. First, RNAs were extracted and examined by polyacrylamide gel electrophoresis after 3' end labeling. The 3' end labeling revealed RNA bands corresponding to H/ACA snoRNAs associated with Gar1-TAP (Figure 2.2A, lane 3). A band corresponding to S1-snR30 was enriched when single step streptavidin purification was done (Figure 2.2A, lane 4). Bands for 5.8S, 5S and tRNAs could also be detected but these are normal contaminants of 3' end labeling (Dragon *et al.*, 2002 ; Dunbar *et al.*, 1997). In order to specifically identify snoRNAs, northern blot analyses of purifications done in one step (Figure 2.2B) or two steps (Figure 2.2C) were made. We were able to selectively isolate snR30 snoRNA in a one-step purification using streptavidin beads (Figure 2.2B). However, we realized that this one-step method brought many non-specific proteins (data not shown). Severe protein contamination in single-step purification protocols with RNA tags is not uncommon (Hogg et Collins, 2007). To minimize protein contamination, we first enriched the sample in H/ACA snoRNPs through Gar1-TAP purification, and then used the S1 aptamer in a second round of purification. Fewer proteins were detected with the two-step purification procedure. Importantly, we were able to specifically recover the snR30 snoRNA (Figure 2.2C). Note that in Figure 2.2C, the fuzzy signal seen in the

P2 lane of snR10 panel comes from slight degradation of the abundant S1-snR30.

Co-purified proteins isolated in the two-step procedure were analyzed by western blotting. Detection of Cbf5 and Nhp2 indicated that recovered snR30 RNA was associated with H/ACA proteins (Figure 2.3A). Proteins fractionated by PAGE were also visualized by silver staining, and the dominant bands were subjected to MS analysis. As expected, MS results revealed that proteins Gar1, Cbf5, Nhp2 and Nop10 were highly enriched in purified samples indicated in bold in Figure 2.3B. The presence of the four H/ACA proteins demonstrated that the S1 tag did not interfere with their association with snR30 snoRNA, consistent with the observation that S1-tagged snR30 snoRNP is fully functional (Figure 2.1). No proteins of C/D snoRNPs or ribosomal proteins of the large subunit were recovered, indicating that the purification procedure was highly specific for snR30 RNP. A number of novel proteins were also identified by MS analysis: Nop6, translation elongation factor Tef1, RNA polymerase II subunit Rpb7, small ribosomal subunit proteins S9 and S18, and histones H2B and H4 (Figure 2.3B).

2.5.2 Association of TAP-tagged proteins Nop6, Rps9A/B, Rps18A/B, Htb1/2 and Hhf2 with snR30 snoRNA.

To validate the MS results, we carried out IPs with TAP-tagged versions of each protein and analyzed the co-precipitated RNAs by northern hybridization. MS analyses could not discriminate between the two isoforms of ribosomal protein S9 (Rps9A and Rps9B) and S18 (Rps18A and Rps18B), as well as histones H2B (Htb1 and Htb2) and H4 (Hhf1 and Hhf2). Therefore, we carried out IPs with each isoform of these proteins. The efficiency of IPs was evaluated by western blot analysis (Figure 2.10). The IPs confirmed that, like the H/ACA proteins, proteins Nop6, Rps9A/B, Rps18A/B, Htb1/2 and Hhf2 are associated with snR30 snoRNA *in vivo* (Figure 2.4). Only trace amounts of snR30 RNA were detected in control IPs with extracts from the untagged wild-type strain (Figure 2.4, BY4741 lanes). Nop6,

ribosomal proteins S9 and S18, and histones Htb1, Htb2 and Hhf2 are not specific to snR30 since other snoRNAs were co-immunoprecipitated. It is important to underscore that the proteins identified do not co-immunoprecipitate the same set of snoRNAs. None of the snoRNAs analyzed by northern hybridization co-immunoprecipitated with TAP-tagged proteins Rpb7 and Tef1, indicating that they were non-specific contaminants recovered during purification of snR30 snoRNP. Contamination of purified RNPs with Tef1 is well documented (Oeffinger *et al.*, 2007). For Nop6 IPs, snoRNAs U3, U14, snR4 and snR35 were also detected in addition to snR30; surprisingly, snR35 was the most enriched snoRNA of those tested.

2.5.3 Endogenous Nop6 localizes to the nucleolus and cosediments with snR30 snoRNP in sucrose gradients.

One of the novel proteins associated with snR30 snoRNP is Nop6, a protein bearing a predicted RNA recognition motif and a putative coiled-coil motif (our unpublished observations). Little is known about Nop6, though bioinformatic analyses implied that it functions in rRNA processing (Samanta et Liang, 2003) and large-scale purification analyses indicated that it interacts with Gar1, Cbf5 and Nhp2, three of the four H/ACA proteins (Ho *et al.*, 2002 ; Krogan *et al.*, 2006 ; Krogan *et al.*, 2004). These features make Nop6 a perfect candidate to associate with the snR30 RNP. Previous high-throughput studies showed that GFP-tagged Nop6 localized to the nucleolus (Huh *et al.*, 2003). However, this study mentions the fact that fusion of the GFP protein may cause mislocalization through steric hindrance or interruption of critical localization/retention sequences. To determine the cellular localization of endogenous Nop6, we carried out immunolocalization experiments with purified anti-Nop6 antibodies. We confirmed that endogenous Nop6 co-localizes with the nucleolar protein Nop1. We also investigated whether the depletion of snR30 snoRNA would alter the nucleolar localization of Nop6. Although a slight staining of

Nop6 was detected in the nucleoplasm, the bulk of Nop6 remained in the nucleolus even after 12h depletion of snR30 snoRNA (Figure 2.5).

We also examined whether Nop6 cosediments with snR30 snoRNA in sucrose gradients, and if the absence of either molecule would have an effect on the sedimentation profile of the other molecule. Figure 2.6A shows the sedimentation profile of snR30 RNA in various strains. In the GAR1-TAP strain and the GAL::SNR30 strain grown in YPGal, snR30 snoRNA is most highly concentrated in low molecular weight fractions, corresponding to a sedimentation coefficient of about 40S (Figure 2.6A). In the GAL::SNR30 strain, larger amounts of snR30 RNA are seen in fractions 4 through 8; this modified sedimentation pattern could result from the high expression levels of snR30 snoRNA, which is under the control of the strong GAL1 promoter. When transcription of snR30 was turned off for 12 h in the GAL::SNR30 strain, the remaining snR30 snoRNA accumulated in the ~40S fraction and fraction 16, which corresponds to complexes that are larger than polysomes. When Nop6 is absent (profile with deletion strain *nop6Δ*), there is a gradual trailing of snR30 RNA towards fractions 4, 5 and 6, which is different from the profile seen with the GAR1-TAP strain. This indicates that in the absence of Nop6, a larger proportion of snR30 snoRNP sediments in higher molecular weight complexes. The sedimentation profile of Nop6 was also analyzed (Figure 2.6B). In the GAR1-TAP strain and the GAL::SNR30 strain grown in YPGal, Nop6 cosedimented with snR30 snoRNP in low-density fractions (Figure 2.6B). However, when snR30 snoRNA was depleted, Nop6 was still found in low-density fractions. Taken together, these results suggest that Nop6 does not require snR30 snoRNP to sediment with complexes of ~40S, but the absence of Nop6 somewhat shifts snR30 snoRNP association to complexes larger than 40S. To determine if the absence of snR30 snoRNA would have an impact on Nop6 association with other snoRNAs, snR30 RNA was depleted and Nop6-TAP IPs for were carried out. In the absence of snR30 snoRNA,

association of Nop6 with snoRNAs U3, U14, snR4 and snR35 was disrupted (Figure 2.7).

2.5.4 The snR30 snoRNA is required for cleavage at site A0, A1 and A2 and absence of Nop6 affects cleavage at site A2.

It was previously shown that cleavage of pre-rRNA at site A0 is dispensable for growth (Venema et Tollervey, 1999). Atzorn *et al.* (Atzorn, Fragapane et Kiss, 2004) reported that snR30 snoRNP is involved in cleavages at sites A0, A1 and A2 but this was based on northern blot results from Morrissey and Tollervey (Morrissey et Tollervey, 1993). Using the primer extension method, which is a more precise approach because the exact position of any break/cleavage can be mapped, we demonstrate that snR30 snoRNP is required for cleavages at sites A0, A1 and A2. Wild-type strain YPH499 was used as a positive control for cleavages; primer extension stops can be observed at the 5' end of the pre-rRNA and at the A0, A1 and A2 cleavage sites (Figure 2.8). When cells were depleted of snR30 snoRNA, there was a complete loss of the primer extension signal corresponding to site A0 and A2 cleavages (Figure 2.8A and C). Since the A1 cleavage site corresponds to the 5' end of mature 18S rRNA, which is still abundant even after a 12 hour depletion of snR30 RNA, we could not see variations in primer extension signal corresponding to site A1 cleavage when using the 18S probe (Figure 2.8B). However, the signal for the 5' end is stronger when snR30 RNA is depleted, suggesting that there is accumulation of pre-rRNA that is not cleaved at site A1 when snR30 snoRNA is absent. Since Nop6 is not an essential protein, we wanted to determine whether Nop6 could be implicated in cleavage at site A0, which is dispensable for growth. Primer extension experiments with RNAs isolated from the *nop6* Δ strain generated similar results to wild-type strain YPH499 for A0 and A1 cleavage sites, indicating that Nop6 is not required for these cleavages. Interestingly, a slight decrease in primer extension stop for cleavage

at site A2 was observed with RNAs isolated from the *nop6Δ* strain compared to wild-type strain.

2.5.5 Absence of snR30 snoRNP impairs mature SSU processome assembly.

We carried out EM analysis of chromatin spreads prepared from cells of GAL::SNR30 strain grown in YPGal and cells grown for 5 h in YPD to deplete snR30 snoRNA (Figure 2.9). Depletion of snR30 RNA appeared to have little effect on rRNA transcription based on the high density of transcripts on many rRNA genes (Figure 2.9B) similar to non-depleted cells (Figure 2.9A). However, normal co-transcriptional rRNA processing events were impaired in snR30-depleted cells. Specifically, formation of SSU processomes and cleavage of nascent transcripts at site A2 did not occur after snR30 snoRNA depletion, although both occurred as expected (Osheim *et al.*, 2004) in non-depleted cells. (Compare the blowups of transcripts at the 3' end of genes in Figures 2.9A and 2.9B, with cleaved transcripts seen in 2.9A and uncleaved transcripts seen in 2.9B).

2.6 DISCUSSION

The H/ACA snoRNA snR30 has no known pseudouridylation target but it is essential for the early processing events that lead to 18S rRNA production. The mechanism by which snR30 snoRNP participates in these cleavage reactions is still a mystery. Identifying the protein components of snR30 snoRNP could give us insights into its function in pre-rRNA processing reactions. With the two-step purification procedure that we designed (purification of H/ACA snoRNPs through Gar1-TAP in the first step, followed by selective isolation of S1-tagged snR30), we were able to recover the snR30 RNA, the four H/ACA proteins and eight novel proteins: Nop6, Rps9A/B, Rsp18A/B, Htb1/2 and Hhf2. The snR30 snoRNP was purified previously by the Lührmann group (Lübben *et al.*, 1995), who carried out an anti-TMG immunoaffinity chromatography to enrich the samples in TMG-capped RNPs followed by U1 snoRNP depletion and Mono Q anion-exchange chromatography. They identified seven snR30-associated proteins with apparent molecular masses of **65**, 48, 46, 38, **25**, **23**, **10** kDa, four of which (in bold) were later identified as H/ACA proteins (Watkins *et al.*, 1998). Because other snoRNAs as well as snRNAs were detected in the purified samples, it remained unclear whether the 48, 46 and 38 kDa proteins were genuine snR30-associated proteins. The authors even suggested that the 38 kDa protein might be Nop1, a common protein of the C/D snoRNPs. The Lührmann group subsequently used the same purification scheme in order to identify snR30 proteins via mass spectrometry (Watkins *et al.*, 1998); they identified the four H/ACA common proteins and Sm proteins, but not the previously isolated 48, 46 and 38 kDa proteins. It is therefore possible that the 48, 46 and 38 kDa proteins are not snR30-associated proteins. A more recent affinity purification of the snR30 snoRNP by Liang and Fournier (Liang et Fournier, 2006) showed that it was associated with the DEAD-box RNA helicase Has1. To purify snR30 snoRNP, these authors inserted the human U1 hairpin II sequence in the snR30 snoRNA, and the construct was expressed in a strain that also expressed the HA-tagged UA1 protein, which specifically binds to U1 hairpin II. We did not find Has1 in our preparations of

purified snR30 RNP. This could be due to the purification method, which was different from that of Liang and Fournier (Liang et Fournier, 2006). It is also possible that the site where the S1 aptamer was inserted in snR30 snoRNA could interfere with Has1 binding. In any case, it is known that Has1 is not an snR30-specific protein because it was strongly associated with U3, U14 and snR63 snoRNAs, and with U1 and U6 snRNAs (Liang et Fournier, 2006). Similarly, DEAD-box RNA helicase Rok1 was shown to be specifically required for the release of snR30 snoRNP from pre-ribosomal particles (Bohnsack, Kos et Tollervey, 2008) but Rok1 was not found in our purified complexes. This could also be explained by the transient nature of the interactions between RNA helicases and RNA. Only small amounts of snR30 were purified with our two-step purification method. The snR30 snoRNP might not be easily accessible when associated with the SSU processome. Similarly, small quantities of snoRNAs were co-purified with TAP-tagged proteins. This can be explained by the fact that most of ribosomal proteins S9 and S18 are associated with mature ribosomes while most of the histones H2B and H4 are associated with DNA, which leaves only small amounts of these proteins that can participate in ribosome biogenesis. As for Nop6, since it is more strongly associated with snR35 snoRNA, it might only associate transiently with other snoRNAs.

We found that Nop6 can associate with snR30 snoRNP. Nop6 has many features that make it a perfect candidate to function with the snR30 RNP: it contains putative RRM and coiled-coil motifs (our unpublished observations), it localizes to the nucleolus (Huh *et al.*, 2003), it is associated with H/ACA proteins (Ho *et al.*, 2002 ; Krogan *et al.*, 2006; Krogan *et al.*, 2004) and it is implicated in 40S ribosomal subunit biogenesis (Garcia-Gomez *et al.*, 2011). Nop6 could bind directly to snR30 snoRNA through its RRM or via protein-protein interactions using its coiled-coil motif. However, Nop6 is not an snR30-specific protein. In fact, we found that Nop6 interacts more strongly with snR35 H/ACA snoRNA (Figure 2.4). This is interesting when considered in view of recent work by Buchhaupt *et al.* (Buchhaupt, Kotter et

Entian, 2007) who found that mutations in Nop6 can suppress malfunction of Nep1, an N1-specific pseudouridine methyltransferase that modifies Ψ 1191 of 18S rRNA (Wurm *et al.*, 2010). The H/ACA snoRNA snR35 mediates isomerisation of U1191 into Ψ 1191, which is required for proper D-site cleavage (Liang, Liu et Fournier, 2009). Although Nop6 is not essential for yeast growth, the absence of Nop6 reduces the efficiency of cleavage at site A2 [Figure 2.8C and (Garcia-Gomez *et al.*, 2011)]. The absence of Nop6 could have discrete effects on rRNA structure near U/ Ψ 1191, which in turn could hinder proper A2 cleavage. These structural changes could affect the levels of mature rRNA but not to a point where an effect on growth could be observed (Garcia-Gomez *et al.*, 2011). Alteration of 18S rRNA structure triggered by the absence of Nop6 could explain why a knock-out of Nep1 is tolerated in the mutant strain (Buchhaupt, Kotter et Entian, 2007). Interestingly, Nop6 interaction with snR35 and other snoRNAs is disrupted when snR30 snoRNA is absent (Figure 2.7) but Nop6 still cosediments with complexes of ~40S. This could reflect structural changes in 18S rRNA due to the lack of early cleavages; these structural changes would prevent binding of certain snoRNAs to 18S rRNA but not binding of Nop6.

Ribosomal proteins Rps9 and Rps18, which are conserved from bacteria to humans, were found in association with snR30 RNA. This suggest that they have extra-ribosomal roles (Wool, 1996) in rRNA biogenesis and processing, as has been demonstrated for Rps19 and Rps24 (Choesmel *et al.*, 2008 ; Léger-Silvestre *et al.*, 2005). Indeed, Rps9 was previously identified as a stable component of the SSU processome together with a few other ribosomal proteins (such as Rps4, Rps6, Rps7, Rps9, and Rps14) thus implicating these proteins in cleavages A0, A1 and A2 (Bernstein *et al.*, 2004 ; Dragon *et al.*, 2002). Rps9 and Rps18 could have a similar function when associated with snR30 snoRNP. In yeast, Rps9 and Rps18 are expressed from duplicated genes. Rps9A and Rps9B are 97% identical, while Rps18A and Rps18B have identical amino acid sequences. Our results show that

levels of snR30 snoRNA associated with Rps9A and Rps9B are similar (Figure 2.4). However, Rps18A was more strongly associated with snR30 snoRNA than Rps18B. It was shown by Komili *et al.* (Komili *et al.*, 2007) that there are differences between the functional roles of ribosomal protein paralogs when cells are lacking specific ribosomal proteins. More specifically, loss of proteins Loc1 or Puf6, which are implicated in ribosomal assembly, caused paralog-specific localization defects of GFP-tagged ribosomal proteins. For example, Rps18B localizes to a region consistent with the endoplasmic reticulum in *loc1* Δ cells, while Rps18A exhibits wild-type localization. We found that Rps9A and Rps9B do not bind the same population of snoRNAs, and this is also the case for Rps18A and Rps18B (Figure 2.4). These results support the view that Rps9 and Rps18 duplicates could have different roles in ribosome biogenesis and function. Differences in the moment at which the proteins are expressed or in the expression levels could explain the functional differences observed between the two identical Rps18 proteins. As mentioned above, Rps9 has been identified as a stable component of the SSU processome (Bernstein *et al.*, 2004). Here we show that Rps9 can co-immunoprecipitate other snoRNAs, implying that the SSU processome could contain not only the U3 snoRNP and pre-rRNA, but also a subset of processing and modifying snoRNPs.

Supporting this idea, we have demonstrated by EM visualization that snR30 snoRNA is required for the formation of the SSU processome which is seen at the 5' end of nascent rRNA transcripts (Figure 2.9). Thus, the role of snR30 snoRNP in pre-rRNA processing could be directly linked to the formation of these large terminal knobs since they are required for pre-rRNA processing reactions, including cleavage at sites A0, A1 and A2 (Dragon *et al.*, 2002 ; Osheim *et al.*, 2004). No or only small 5' end RNP particles can be observed when snR30 RNA is depleted, suggesting that the role of snR30 snoRNP might be to stabilize U3 snoRNP binding to nascent pre-rRNA and/or to chaperone the assembly steps and structural rearrangements that

result in SSU processome formation. Our results are consistent with the recent identification of the snR30 snoRNA binding site within 18S rRNA (Fayet-Lebaron *et al.*, 2009) in a region that becomes compacted into the SSU processome (Osheim *et al.*, 2004).

We also found that snR30 snoRNP is associated with histones H2B (Htb1 and Htb2) and H4 (Hhf2). It has been shown that histones H3 and H4 do not negatively regulate transcription but are rather associated with actively transcribed rRNA genes; indeed they are components of the upstream activating factor (UAF), a transcription factor required for RNA polymerase I transcription in *S. cerevisiae* (Tongaonkar *et al.*, 2005). It is possible that snR30 snoRNP could act as a chaperone, linking rRNA transcription and processing at early stages of rRNA transcription. Interaction of snR30 snoRNP with histones could mediate its recruitment to the nascent SSU processome, facilitating co-transcriptional cleavage of the pre-rRNA at sites A0, A1 and A2.

A general feature of IPs with TAP-tagged proteins was that the signal for snR30 snoRNA was weak, although consistently above background levels seen in control IPs made with extracts prepared from the untagged strain BY4741. Similar results have been observed with ribosomal proteins that associate with the U3 snoRNA (Bernstein *et al.*, 2004). Since most ribosomal proteins are constituents of cytoplasmic ribosomes, only a tiny fraction of these proteins could be implicated in pre-rRNA processing and maturation. Similarly, most histones are associated with non-ribosomal DNA, leaving only few histone molecules associated with rDNA and snR30 snoRNP. It is also possible that the low levels of snR30 RNA co-immunoprecipitated with Nop6, ribosomal proteins and histones could reflect transient association between these molecules. In any case, the identified proteins clearly associate with snR30 snoRNA, but like the common H/ACA proteins, they are not snR30-specific.

The major aim of this work was to identify the protein content of snR30 snoRNP since the identification of such proteins could help us understand how snR30 snoRNP participates in early pre-rRNA processing events. We have identified novel proteins that associate with snR30 and other snoRNAs. These proteins could be implicated in ribosomal RNA maturation. Overall, our findings give insights into snR30's function, and how it could link rRNA transcription and processing via its interaction with histones and its role in SSU processome assembly.

2.7 FUNDING

Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) PhD studentship (to V.L.); FQRNT (NC-80168), Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ; NC-2843), Canadian Institutes of Health Research (MOP-64290) (to F.D); National Science Foundation (MCB-0818818) (to A.L.B.); Chercheur-boursier award of the FRSQ (to F.D.). Funding for open access charge: FRSQ.

2.8 ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to David Engelke (University of Michigan), Yves Henry (Université de Toulouse), Michael Pollard (The Scripps Research Institute) and Bernard Turcotte (McGill University) for reagents and advice, and to Jesus de la Cruz (University of Sevilla) for critical reading of the manuscript and communicating data prior to publication. We also thank Krasimir Spasov, Catherine Payant and Martin Lapansée for technical assistance.

2.9 FIGURE LEGENDS

Figure 2.1: S1-tagged snR30 is functional *in vivo*. (A) Schematic secondary structure of aptamer-tagged snR30 (not to scale). Box H, box ACA, S1 aptamer, motifs m1 and m2 are indicated. Arrows point to the site where the minimal S1 aptamer was introduced. Residues flanking the S1 aptamer are numbered. (B) Ten-fold dilutions of cells were spotted from left to right on YPGal or YPD plates. YPH499 is the parental wild-type strain. Strain GAL::SNR30T was transformed with the empty vector pRS316 (Vector), plasmid pRS316-SNR30 encoding untagged snR30 (WT-SNR30) or plasmid pRS316-S1-SNR30 encoding S1-tagged snR30 (S1-SNR30). (C) Growth curves in YPD of strains GAR1-TAP, GAL::SNR30T and S1-SNR30 after shift from YPGal to YPD.

Figure 2.2: Selective purification of S1-tagged snR30 snoRNP. One-step (A and B) or two-step (C) purifications were done with extracts prepared from the S1-SNR30

strain grown in YPD. (A) 3' end labeling analysis of recovered RNAs. Labeled RNAs from the extract (T), Gar1-TAP IP, and S1-snR30 purification were analyzed. Radiolabelled DNA markers (M) were run in parallel. S1-snR30, H/ACA snoRNAs, 5.8S, 5S and tRNAs are indicated. (B) Northern blots of RNAs recovered from a one-step purification: extract (T), streptavidin flow through (S) and eluate (P). (C) Northern blots of RNAs recovered from a two-step purification: extract (T), IgG flow through (S1), IgG eluate (P1) and streptavidin eluate (P2). For B and C, snoRNAs analyzed are indicated on the right of each panel.

Figure 2.3: Purified S1-snR30 contains H/ACA proteins and a number of additional proteins. Proteins present in the extract (T), IgG eluate (P1) and streptavidin eluate (P2) were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting to detect Cbf5 and Nhp2 (A). In (B), the Criterion gel was silver-stained. Proteins identified by MS are indicated on the right. The molecular weights of protein markers (lane 1) are indicated on the left in kDa.

Figure 2.4: Analysis of snoRNAs that co-immunoprecipitate with TAP-tagged proteins. RNAs from total extract (T; 1% input), supernatant (S; 1%) and immunoprecipitates (P; 100%; Gar1-TAP 20%) were detected by Northern hybridization. TAP-tagged proteins are identified at the top. Untagged BY4741 strain was used to determine background levels of immunoprecipitated snoRNAs, which are indicated on the right of each panel. The asterisk (*) indicates blots with multiple bands: snR84 is the bottom band, snR35 is the top band, and snR4 is the bottom band.

Figure 2.5: Nop6 localizes to the nucleolus in normal and snR30 snoRNA-depleted cells. S1-SNR30 cells grown in YPD, and GAL::SNR30 cells grown in YPGal (t = 0) and YPD for 12 hours (t = 12) were fixed and immunostained with purified anti-Nop6 antibodies (green) and anti-fibrillarin (Nop1) monoclonal antibody (red). The overlay is shown with the DAPI staining.

Figure 2.6: Sucrose gradient sedimentation analysis. Cellular extracts prepared from strains GAR1-TAP, GAL::SNR30 either undepleted (t=0) or depleted for 12 h (t=12), and *nop6* Δ were fractionated on sucrose gradients. Total extract (T) and gradient fractions (1 to 16) are indicated. The positions of 40S and 60S ribosomal subunits, 80S ribosomes, and polysomes are indicated, based on the continuous A_{254} absorbance profile. Northern blotting (A) was done with a 32 P-labeled oligonucleotide complementary to snR30 snoRNA. (B) Western blots of corresponding gradients were carried out with anti-Nop6 antibodies.

Figure 2.7: Depletion of snR30 snoRNA disrupts Nop6 association with other snoRNAs. RNAs from total extract (T; 1% input), supernatant (S; 1%) and immunoprecipitates (P; 100%) were detected by Northern hybridization. Strains used and depletion time are indicated at the top. Untagged BY4741 strain was used to determine background levels of immunoprecipitated snoRNAs, which are indicated on the right of each panel. The asterisk (*) indicates blots with multiple bands: snR30 is the top band, snR84 is the bottom band, snR35 is the top band.

Figure 2.8: Primer extension analysis of pre-rRNA processing at sites A0, A1 and A2. Total RNA used for primer extension was extracted from wild-type strain YPH499, strain *nop6* Δ or strain GAL::SNR30 grown for 12 h in YPD. The primers hybridize downstream of the A0 site (A), at the 5' end of mature 18S rRNA (B) and between A2 and A3 sites (C). The position of the primer extension stops at the 5' end of the pre-rRNA or as a result of the cleavages are indicated.

Figure 2.9: EM analysis of chromatin spreads from yeast strain GAL::SNR30. The strain was grown in YPGal (A; non-depleted) and shifted to YPD for 5 h to deplete cells of snR30 snoRNA (B). Examples of two representative rRNA genes from non-depleted cells are shown in (A), while (B) shows an overview of several active rRNA

genes from depleted cells, at the same magnification as genes in (A). Scale bars = 0.4 μm . Arrows in (A) indicate SSU processomes. In both (A) and (B), a blowup is shown of the 3' end of a gene (both at the same magnification and both demarcated by black boxes). Scale bars in blowups = 0.2 μm .

2.10 FIGURES

Figure 2.1

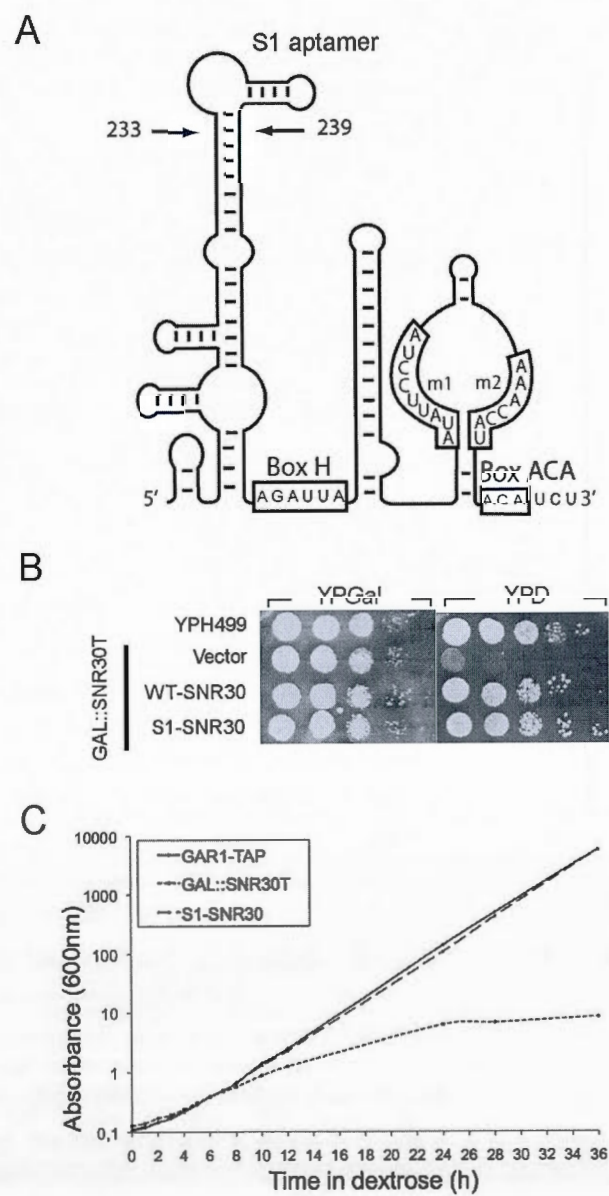


Figure 2.2

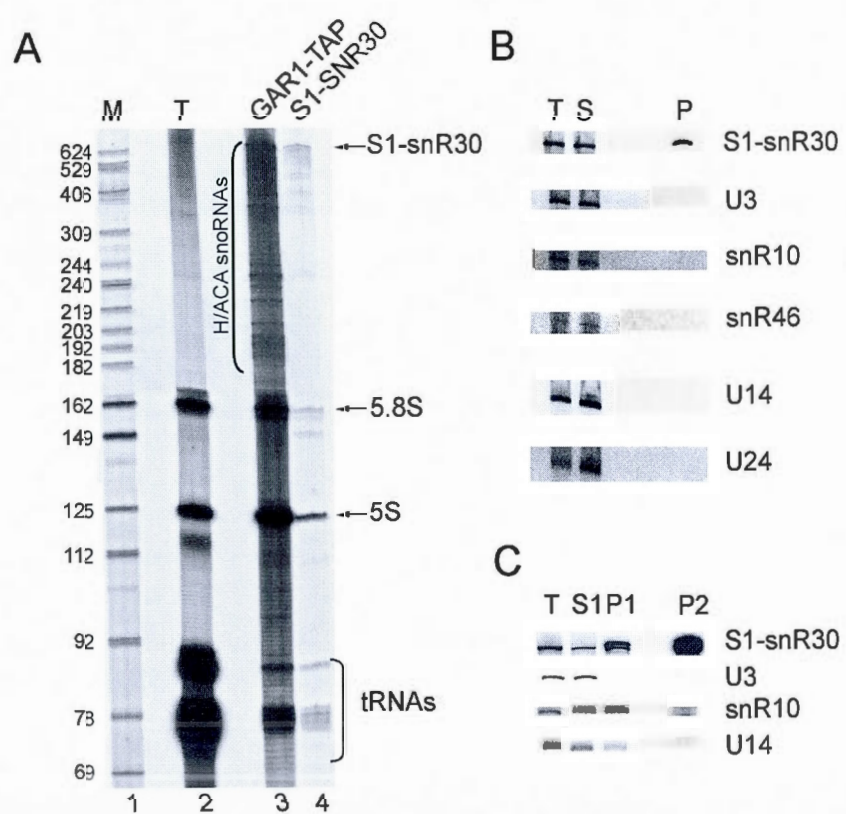


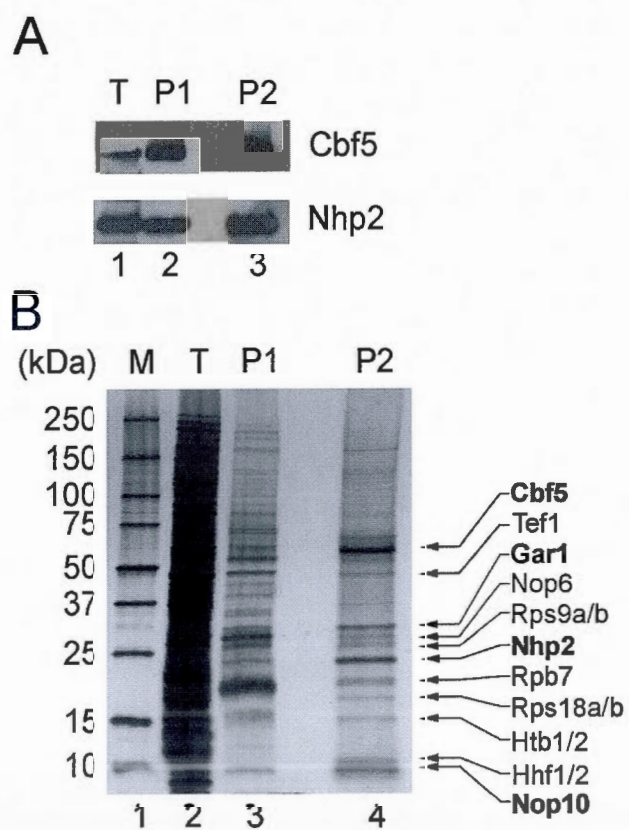
Figure 2.3

Figure 2.4

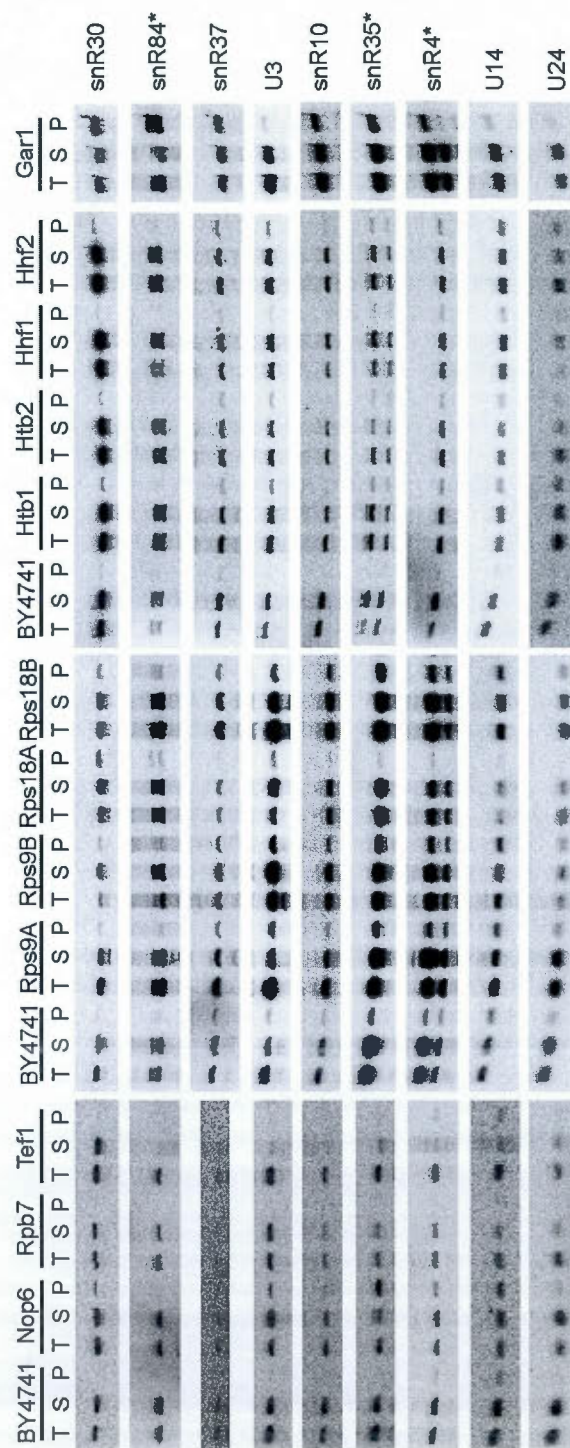


Figure 2.5

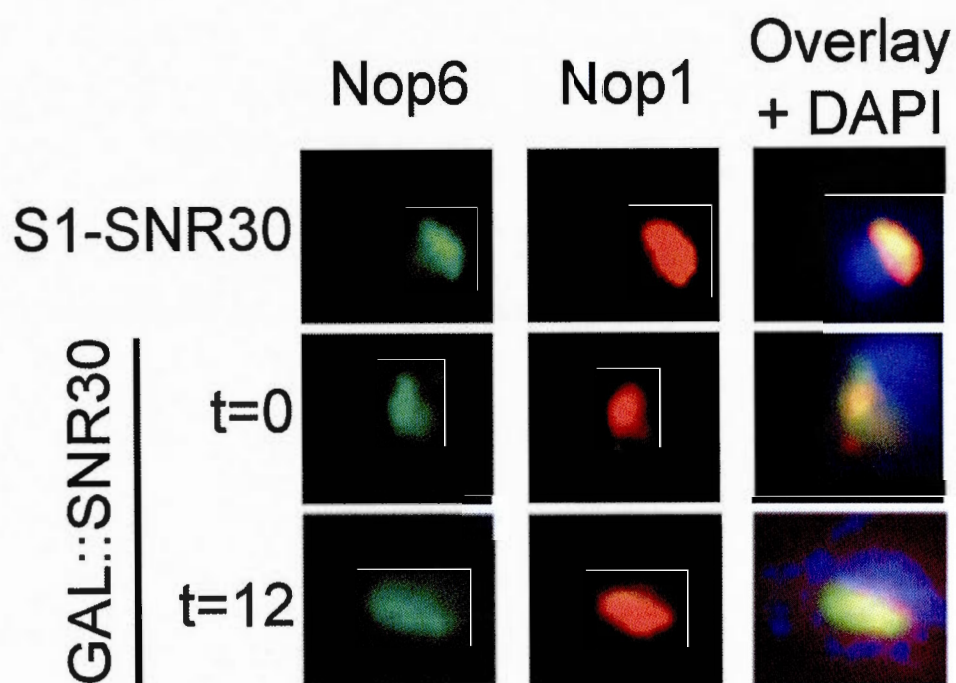


Figure 2.6

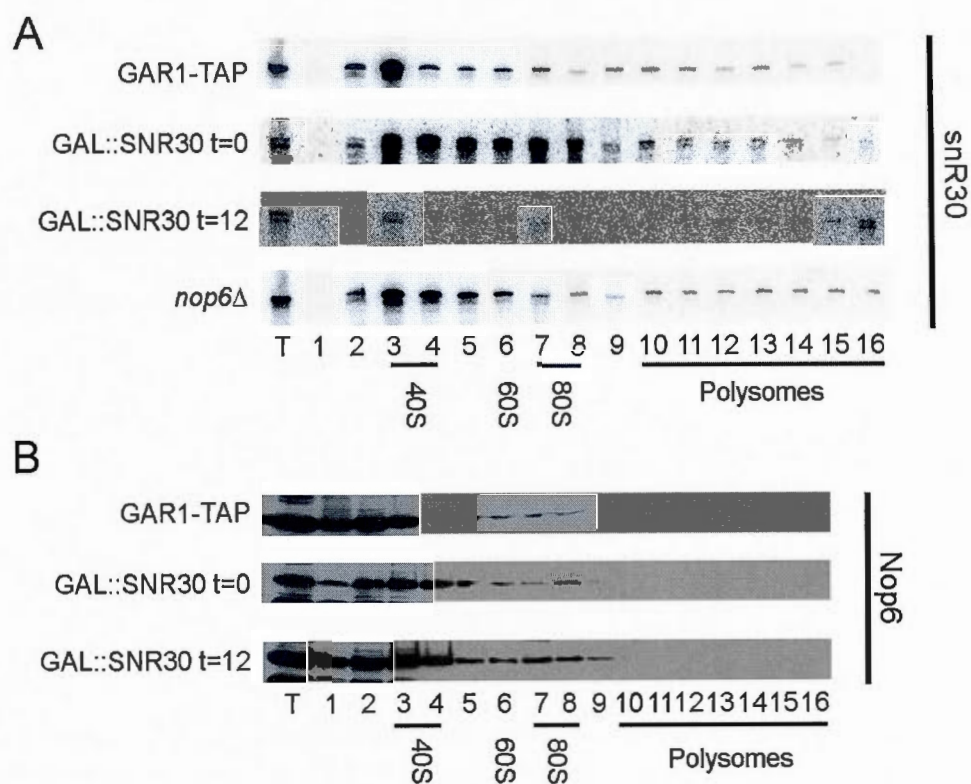


Figure 2.7

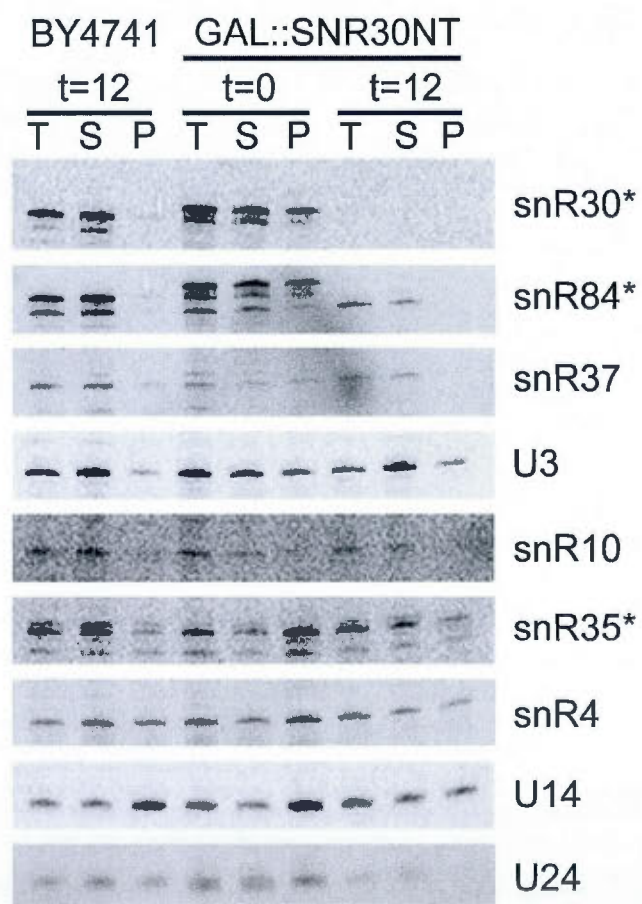


Figure 2.8

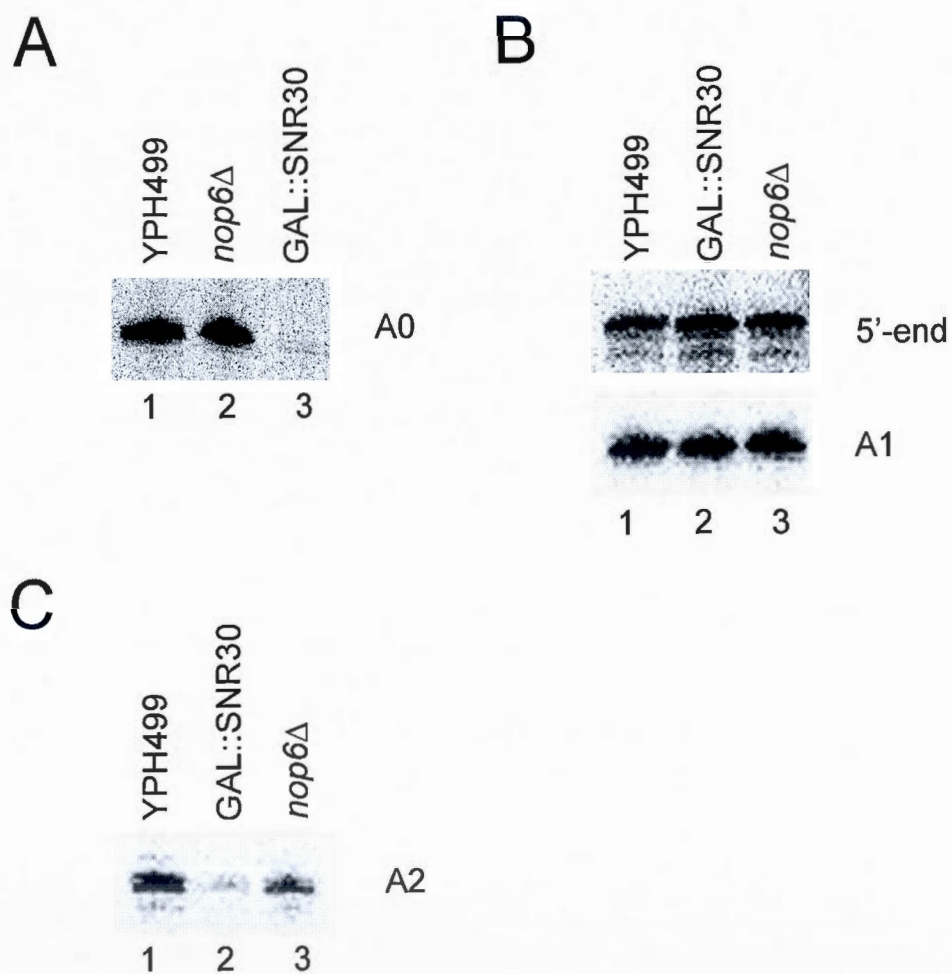
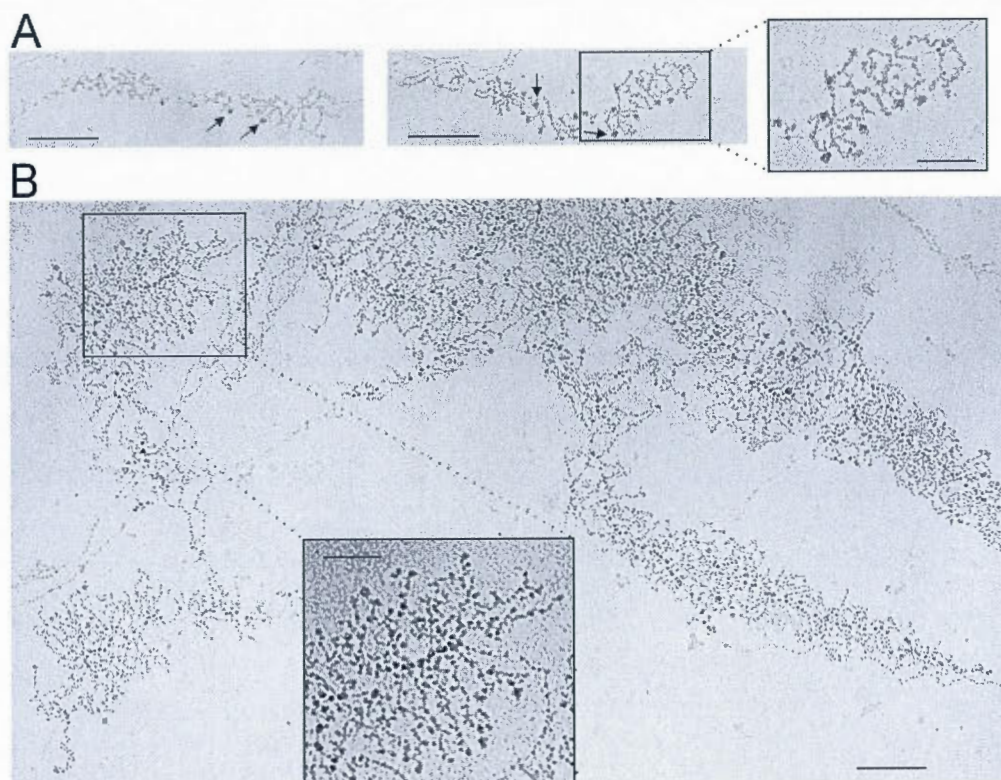


Figure 2.9

2.11 SUPPLEMENTAL DATA

Table 2.1 : Yeast strains

Strain	Alias	Genotype	Source
YPH499	-	MATa <i>ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	ATCC
VLY1	GAR1-TAP	YPH499, <i>GAR1-TAP::TRP1</i>	This work
VLY2	<i>GAL::SNR30</i>	YPH499, <i>PGAL1-SNR30::kanMX6</i>	This work
VLY3	<i>GAL::SNR30T</i>	VLY1, <i>PGAL1-SNR30::kanMX6</i>	This work
VLY4	<i>GAL::SNR30V</i>	VLY3, <i>pRS316::URA3</i>	This work
VLY5	WT-SNR30	VLY3, <i>pRS316-SNR30::URA3</i>	This work
VLY6	S1-SNR30	VLY3, <i>pRS316-S1-SNR30::URA3</i>	This work
BY4741	-	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems
VLY7	NOP6-TAP	BY4741, <i>NOP6-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY8	RPB7-TAP	BY4741, <i>RPB7-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY9	TEF1-TAP	BY4741, <i>TEF1-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY10	RPS9A-TAP	BY4741, <i>RPS9A-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY11	RPS9B-TAP	BY4741, <i>RPS9B-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY12	RPS18A-TAP	BY4741, <i>RPS18A-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY13	RPS18B-TAP	BY4741, <i>RPS18B-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY14	HTB1-TAP	BY4741, <i>HTB1-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY15	HTB2-TAP	BY4741, <i>HTB2-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY16	HHF1-TAP	BY4741, <i>HHF1-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY17	HHF2-TAP	BY4741, <i>HHF2-TAP::his3MX6</i>	Open Biosystems
VLY18	<i>nop6Δ</i>	BY4741, <i>nop6Δ::kanMX6</i>	Open Biosystems
VLY19	<i>GAL::SNR30NT</i>	VLY7, <i>PGAL1-SNR30::kanMX6</i>	This work

Table 2.2 : Oligonucleotides

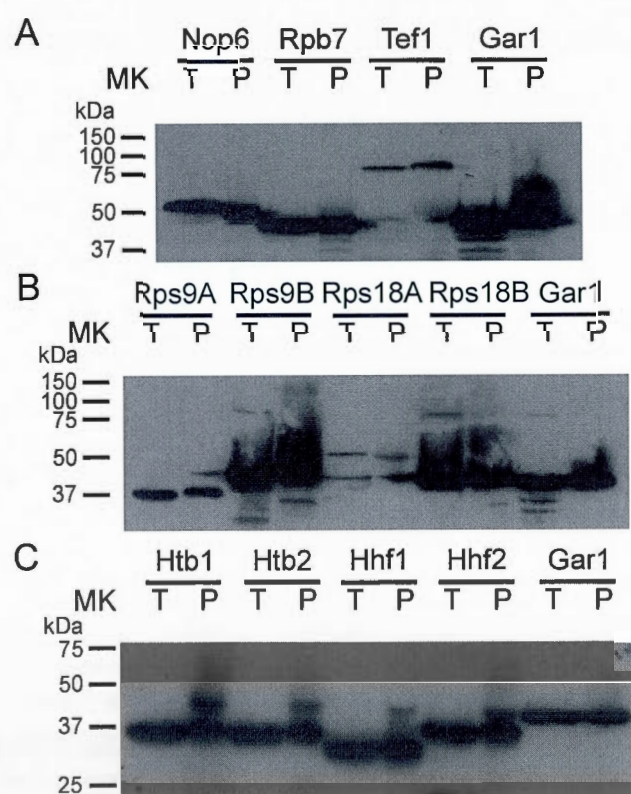
Name	Sequence
Anti-snR4	5'-AAGGCCACGGCACAATCCAC-3'
Anti-snR10	5'-CAATCCTTGCAACGGTCCTCATCC-3'
Anti-snR30	5'-GGAATATACTGCGGTAGGACGAAC-3'
Anti-snR35	5'-TGATGATCTCTCCGATGGAC-3'
Anti-snR37	5'-GAGCAAGCTCCTCATCACTC-3'
Anti-snR46	5'-TCTACGGATCTTCGAAGAGGCCAT-3'
Anti-snR70	5'-ATGAGAGTAGACGGCGACCC-3'
Anti-snR84	5'-GAGTCATGTTCTTAGCTTCTTT-3'
Anti-U3	5'-CCAAGTTGGATTCACTGGCTC-3'
Anti-U14	5'-CGATGGGTTTCGTAAGCGTACTCCTACCGTGG-3'
Anti-U24	5'-GGTATGTCTCATTTCGGAACCTCAAAGTTC-3'
Anti-S1	5'-AGCTTCCCGGCCCGCGACTATCTTACGCACT-3'
SNR30-Clal For	5'-CCATCGATCTGTAAATTGCTCTTACTACAAACC-3'
SNR30-Clal Rev	5'-CCATCGATCATGGAAGTGGGCCAAGGGAATTA-3'
GAL1::SNR30 For	5'-ACTTCTTTTCCCATTCGAAGTTTCTCTTTGCTTATTTGTAAAAAAG TGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'
GAL1::SNR30 Rev	5'-GTGACTTCCCTTCCCTGTATAGTACCGAACTAGCACGAGACTATGGT TTTTGAGATCCGGGTTTT-3'
S1-SNR30 for	5'-CCCGGCCCGCGACTATCTTACGCACTTGCATGATTCTGGTCGGTGA TCAGAGGAGAAGTCAGGAGC-3'
S1-SNR30 rev	5'-ACCGACCAGAATCATGCAAGTGCGTAAGATAGTCGCGGGCCGGGG ATCAGAGTTTTGAGTCGTCAGAC-3'
GAR1-TAP For	5'-AGAGGAGGATCTCGTGGCGGATCTCGTGGTGGTTTCAGAGGAGGTA GAAGAGGATCCATGGAAAAGAGAAG-3'
GAR1-TAP Rev	5'-AATTGTGAAAGATAAAGGATGGTTTTTTTTTTATTTTTTCTAGCTAG ATACGACTCACTATAGGGCG-3'
pGEX-NOP6 For	5'-GCGGGATCCGGGTCCGAGGAAGATAAAAAG-3'
pGEX-NOP6 Rev	5'-CGCCTCGAGTCATTTAAGTAGTTTGGCTC-3'
A0-A1	5'-CCAGATAACTATCTTAAAAG-3'
18S	5'-CATGGCTTAATCTTTGAGAC-3'
A2-A3	5'-TTGTTACCTCTGGGCCC-3'

2.12 SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure 2.10. Western blot analysis of tagged proteins. Proteins from total extract (T; 10% input) and IP pellet (P; 100%) were separated on 10% SDS-PAGE analyzed by western blot using peroxidase anti-peroxidase antibodies. Tagged protein is identified at top. The molecular weights of protein markers (MK) are indicated on the left in kDa.

2.13 SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure 2.10



CHAPITRE III

DIFFÉRENCES FONCTIONNELLES ENTRE LES PROTÉINES RIBOSOMIQUES RPS18A ET RPS18B

3.1 AVANT PROPOS

Nous avons analysé les protéines ribosomiques Rps18A et Rps18B afin de comprendre leur rôle quand elles sont associées à la snoRNP snR30. Ces protéines sont exprimées à partir de gènes dupliqués codant pour deux protéines dont la séquence en acides aminés est identique. Nos résultats indiquent que ces protéines sont exprimées et régulées de manière différente et qu'elles ont des fonctions cellulaires distinctes. Nous montrons aussi qu'en plus d'être un constituant du ribosome, la protéine S18 est essentielle à la maturation de l'ARNr 18S. Somme toute, nos résultats suggèrent que Rps18B a un rôle plus important dans la maturation des ARNr tandis que Rps18A serait plus impliqué dans l'assemblage des ribosomes.

J'ai conçu et exécuté les expériences de laboratoire ainsi qu'interprété les résultats avec l'aide du Dr François Dragon. J'ai rédigé l'article et conçu les tableaux et les figures sous la supervision du Dr François Dragon. Ces travaux ont été soumis pour publication dans la revue RNA : numéro de manuscrit (MS#) RNA/2012/035832

Functional differences between ribosomal protein paralogs Rps18A and Rps18B

Vincent Lemay and François Dragon¹

Running title: Differences between Rps18A and Rps18B

Keywords: Ribosome, ribosomal protein S18, ribosomal RNA processing, duplicated genes, gene expression

Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

¹ Corresponding author: dragon.francois@uqam.ca

3.2 ABSTRACT

Ribosomal protein S18 is conserved from bacteria (S13) to humans (S18). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, S18 is expressed from duplicated genes that produce proteins of identical amino acid sequence (Rps18A and Rps18B). Previous work showed that S18 is associated with various small nucleolar RNAs suggesting that Rps18A and Rps18B might have a role in rRNA biogenesis, aside from their function in the ribosome. Using strains that conditionally express Rps18A and Rps18B, we show that S18 is essential for 18S rRNA maturation and that absence of Rps18A or Rps18B leads to different defects in rRNA processing. We have also highlighted differences between the *RPS18A* and *RPS18B* genes; these differences might explain the variations in expression levels observed between the two *RPS18* paralogs. Our data also suggest that Rps18B has a more prominent role in rRNA processing than Rps18A.

3.3 INTRODUCTION

The ribosome is a two-subunit ribonucleoprotein complex responsible for the synthesis of proteins in all organisms. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the small ribosomal subunit contains the 18S ribosomal RNA (rRNA) and 33 ribosomal proteins (RPs) whereas the large subunit consists of three rRNAs (25S, 5.8S and 5S), and 46 RPs (Ben-Shem *et al.*, 2010). Yeast cells require over 200 proteins and different small nucleolar RNAs (snoRNAs) to produce functional ribosomes (Kressler, Hurt et Bassler, 2010 ; Piekna-Przybylska, Decatur et Fournier, 2007). Proper maturation of pre-rRNAs first requires the formation of a large processing complex coined the SSU processome (Dragon *et al.*, 2002). Shortly after the start of rDNA transcription, the SSU processome assembles at the 5' end of nascent pre-rRNA transcripts, and it forms the terminal knob observed by electron microscopy (Osheim *et al.*, 2004). Assembly of the SSU processome requires the U3, U14 and snR30 processing snoRNAs (Dragon *et al.*, 2002 ; Lemay *et al.*, 2011 ; Osheim *et al.*, 2004). Although the absence of RRP2 snoRNA (the RNA component or RNase MRP) also affects SSU processome assembly, subparticles can still form at the 5' end of nascent transcripts (Osheim *et al.*, 2004). Early pre-rRNA cleavages at sites A0, A1 and A2 lead to 18S rRNA production; cleavage at site A2 releases the SSU processome from nascent pre-rRNA and the remaining pre-rRNA undergoes a complicated series of cleavages to generate the 5.8S and 25S rRNAs (Osheim *et al.*, 2004). Some RPs have been shown to be associated with the SSU processome (Bernstein *et al.*, 2004).

In *S. cerevisiae*, most RPs are expressed from duplicated genes that encode identical or highly similar proteins. Duplicated RP genes produce mRNAs that usually differ considerably in the untranslated regions (UTRs) and introns [(Planta et Mager, 1998) and references therein]. Rps18 is expressed from duplicated genes (*RPS18A* and *RPS18B*) that encode two identical proteins named Rps18A and Rps18B. S18 is located in the head of the small subunit of the ribosome near Rps5 and Rps19 [(Taylor *et al.*, 2009) and references therein]. Rps18 is one of the few proteins that form a bridge (the B1b bridge) between the small and the large subunits of the ribosome; it does so through its interaction with RP L11 (Ben-Shem *et al.*, 2010).

We previously showed that Rps18A and Rps18B were associated with several snoRNAs (Lemay *et al.*, 2011). This suggested that Rps18A/B might have extraribosomal roles and could participate in rRNA maturation, which has been demonstrated for other RPs such as Rps19 and Rps24 (Choesmel *et al.*, 2008 ; Léger-Silvestre *et al.*, 2005). Indeed, cells depleted of Rps18 showed delays in processing at sites A0, A1 and A2 (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005 ; Léger-Silvestre *et al.*, 2004). Cells that do not express Rps18 are also unable to efficiently export the 20S pre-rRNA from the nucleus (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Interestingly, we found that Rps18A and Rps18B did not bind the same population of snoRNAs and we proposed that Rps18 duplicates might have different roles in ribosome biogenesis and function (Lemay *et al.*, 2011). There is increasing evidence that RPs have extraribosomal

functions (Warner et McIntosh, 2009 ; Wool, 1996) and in yeast, these functions might be paralog-specific. Work by Komili *et al.*, (2007) showed phenotypic differences between RP paralogs in various mutant cells that had defects in ribosome assembly. Although the two Rps18 paralogs have the same amino acid sequence, differences in expression levels of RPs S18A and S18B could account for their functional differences. Moreover, it was shown by Parenteau *et al.*, (2011) that introns of RP genes are required for optimal cell growth; removal of introns affected the expression of the RP paralogs in a nonreciprocal manner, and leads to paralog-specific phenotypic effects. These results suggested that the expression ratio of RP gene paralogs could modulate ribosome function.

In this work, we show that although *RPS18A* and *RPS18B* genes code for two identical proteins, these genes are expressed and regulated differently, and they appear to have specific roles in the ribosome and in rRNA maturation.

3.4 RESULTS

3.4.1 Deletion of *RPS18A* or *RPS18B* leads to growth defects

To evaluate the function of each paralog of Rps18, we generated strains that conditionally express one or the other copy of the *RPS18* gene. The natural promoter of each paralog was replaced by the inducible GAL1 promoter (Longtine *et al.*, 1998) in a strain carrying a deletion of the other paralog. We compared growth of the wild-

type parental strain BY4741 to deletion strains *rps18A* Δ and *rps18B* Δ , and to strains PGAL-S18A/B Δ and PGAL-S18B/A Δ . Growth on solid media shows that the deletion of *RPS18A* or *RPS18B* (*rps18A* Δ and *rps18B* Δ strains) has no major effect on growth, though the colonies are slightly smaller than colonies of the wild-type strain (Figure 3.1A). When both paralogs are absent (PGAL-S18A/B Δ and PGAL-S18B/A Δ grown in dextrose-containing medium) no growth is observed, confirming that at least one copy of *S18* is required for viability. We also analyzed growth rate in liquid media and typical growth curves are presented in Figure 3.1B and 3.1C. When *RPS18* expression is repressed (PGAL strains), growth slows down around 3 hours after the shift in dextrose-containing medium, and cells have almost stopped dividing around 12 hours after shift (Figure 3.1B). In contrast, parental deletion strains *rps18A* Δ and *rps18B* Δ continue to grow after the shift in dextrose-containing medium but at a slower pace than the wild-type strain BY4741. Overexpression of *RPS18* did not rescue the deletion of the other paralog; indeed, when cells express *RPS18* from the strong GAL1 promoter (PGAL strains grown in galactose-containing media), growth rate is reduced compared to wild-type cells (Figure 3.1C). Note that the introduction of the GAL1 promoter in RP genes does not have any deleterious effects on growth (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). Globally, these results indicate that deletion of one copy of *RPS18* causes cells to grow slower, and that the slow growth phenotype cannot be rescued by overexpression of the remaining *S18* paralog.

To understand the effects of individual deletions of *RPS18* paralogs on cell growth, we analyzed polysome profiles on sucrose density gradients using extracts from deletion strains *rps18AΔ* and *rps18BΔ*. Deletion strains appear to have significant alterations in ribosome formation, which is suggested by a massive increase of the 60S peak. Notably, the deletion of *RPS18A* (strain *rps18AΔ*) has a strong effect on polysome profiles with the largest increase of the 60S peak, and a slight loss of 40S, 80S and polysomes; in comparison, strain *rps18BΔ* showed an intermediate increase in the 60S peak, no loss of 80S ribosomes and modest effects on polysomes (Figure 3.1D). The stronger effects of *RPS18A* deletion on polysome profiles suggest that Rps18A is preferentially incorporated in the ribosome.

3.4.2 Expression levels of *RPS18A* and *RPS18B* are different

The different phenotypic defects seen with *RPS18A* and *RPS18B* deletion strains could be due to differences in expression levels of these proteins. We monitored the expression level of *RPS18A/B* mRNAs by northern hybridization. As seen in Figure 3.1E, *RPS18A* and *RPS18B* mRNAs differ in length and are not expressed at the same level: the shorter *RPS18A* mRNA is more highly expressed than the longer *RPS18B* mRNA in wild-type cells (Figure 3.1E, lane 1). The observed differences in *RPS18* mRNA confirm whole-genome mRNA quantitation analyses previously done by Roth *et al.*, (1998). We also analyzed the effect of deleting one *RPS18* paralog on mRNA expression. Deletion of the *RPS18A* gene did not seem to affect *RPS18B* mRNA expression (Figure 3.1E; lane 2). In contrast, when the

RPS18B gene was deleted, a slight increase in *RPS18A* mRNA levels was repeatedly observed (Figure 3.1E; lane 5). We also monitored the expression of each *RPS18* paralog when expressed under the control of the strong GAL1 promoter. As expected, *RPS18A* and *RPS18B* mRNAs were very abundant when expressed from the GAL1 promoter in galactose-containing medium (Figure 3.1E, lanes 3 and 6), and mRNA expression was repressed when cells were grown in dextrose-containing medium for 12 hours (Figure 3.1E, lanes 4 and 7).

3.4.3 Expression levels of Rps18A and Rps18B paralogs affect their association with snoRNAs

We previously showed the association of Rps18A and Rps18B with snoRNAs (Lemay *et al.*, 2011). To determine the impact of the absence of one paralog on the other paralog's association with snoRNAs, we carried out northern blot analyses of snoRNAs associated with HA-tagged Rps18 proteins. We detected differences in snoRNA association between Rps18A-HA and Rps18B-HA; in particular, Rps18B was more tightly associated with snR35 snoRNA (compare lanes 4 and 10 in Figure 3.2A). We also noticed that when one paralog was depleted, the remaining paralog was more tightly associated with U14 snoRNA (Figure 3.2A, compare lane 6 to lane 8, and lane 12 to lane 14)

Intriguingly, when one paralog was expressed from the GAL1 promoter, there was a huge decrease in abundance of the other paralog bearing the HA-tag (Figure

3.2B, lanes 3 and 9). The GAL1 promoter is very strong and leads to overexpression of *RPS18A* or *RPS18B* (Figure 3.1E). Although HA-tagged Rps18 was barely expressed in cells grown in galactose-containing medium, Rps18B-HA was strongly associated with snoRNAs; this is in marked contrast with IPs conducted with Rps18A-HA for which no associated snoRNA could be detected (Figure 3.2A, compare lanes 6 and 12). These results support the idea that Rps18B is more tightly associated with snoRNAs than Rps18A.

3.4.4 Deletion of *RPS18A* or *RPS18B* leads to different pre-rRNA processing defects

Depletion of Rps18 leads to pre-rRNA processing defects at cleavage sites A0, A1 and A2, and to problems in the export of the 20S pre-rRNA from the nucleolus to the cytoplasm (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005). To determine the paralog-specific impact on pre-rRNA processing, we analyzed the effects of depleting a specific Rps18 paralog on the accumulation of the different rRNA precursors. We carried out northern blot analyses on total RNA extracted from strains BY4741 (wild-type), *rps18A*Δ, *rps18B*Δ, PGAL-S18A/BΔ and PGAL-S18B/AΔ. When strains PGAL-S18A/BΔ and PGAL-S18B/AΔ were grown in dextrose-containing media and both paralogs were absent, we observed pre-rRNA processing defects that were described by Ferreira-Cerca *et al.*, (2005), with accumulation of 35S, 32S, 23S and 21S pre-rRNAs, and a decrease in 18S rRNA levels, a phenotype that reflects defects or

delays in cleavages A0, A1 and A2 (Figure 3.3). Similar processing defects were obtained with deletion strains *rps18AΔ* and *rps18BΔ*, except that defects were milder and not accompanied by a loss of mature 18S rRNA. Also, all the modified strains showed a decrease in 27SA2 pre-rRNA levels when grown in dextrose-containing medium, which is consistent with a defect in A2 cleavage (Figure 3.3; lanes 7-10). Interestingly, when strains *rps18AΔ* and *rps18BΔ* were grown in galactose-containing medium, a less efficient carbon source, accumulation of 35S, 32S, and 23S pre-rRNAs was more enhanced in *rps18BΔ* strain than in *rps18AΔ* strain (Figure 3.3, compare lanes 2 and 3). Another important difference was the significant increase in 20S pre-rRNA observed in the *rps18BΔ* strain but not in the *rps18AΔ* strain. Our results suggest that Rps18B has a more important role in rRNA maturation than Rps18A.

3.4.5 Sequence analyses reveal differences between *RPS18A* and *RPS18B*

To better characterize differences between *RPS18* paralogs, we carried out rapid amplification of cDNA ends (RACE) experiments and sequence analyses (Figure 3.4). We began with RACE experiments to identify the 5' and 3' ends of *RPS18A* and *RPS18B* mRNAs. Both paralogs have very short 5' UTRs measuring 21 and 19 nucleotides, respectively. About half of the nucleotides in the 5' UTR are conserved between the two paralogs (Figure 3.4A). The 3' UTR are quite different and much longer with 123 (*RPS18A*) and 188 (*RPS18B*) nucleotides. For each gene,

we also analyzed the DNA sequence in an attempt to identify the promoters, upstream activation sequence (UAS; Figure 3.4B) and polyadenylation [poly(A)] signals and related sequences (efficiency element and positioning element; Figure 3.4A). Possible promoter sequences were identified based on consensus sequence of GA elements in TATA-less genes (Seizl *et al.*, 2011). The distance between the predicted GA element and the transcription start site is 31 base pairs longer for *RPS18B*. The UAS sequences HOMOL1 and RPG box were identified from previous studies on RP genes in *S. cerevisiae* where these elements were characterized (Leer *et al.*, 1985). Like the GA element, the HOMOL1 and RPG box are located further upstream in the *RPS18B* gene. Finally, the poly(A) signal and related efficiency element and positioning element were deduced based on the work of Zhao, Hyman et Moore, (1999) on 3' end formation in eukaryotes. While the poly(A) signal for *RPS18A* is about 100 residues downstream from its termination codon, the poly(A) signal for *RPS18B* is further downstream, that is about 170 residues away from the stop codon.

3.5 DISCUSSION

The majority of *S. cerevisiae* RPs are expressed from duplicated genes that produce identical or nearly identical proteins. It has been proposed that most duplicated RPs could have functional specificity or extraribosomal roles (Komili *et al.*, 2007 ; Warner et McIntosh, 2009). Supporting this hypothesis, we previously reported that Rps18A and Rps18B are associated with snR30 snoRNA, which is required for pre-18S rRNA processing (Lemay *et al.*, 2011); this suggested that

Rps18 is not only a 40S subunit component but could also have a role in rRNA processing. Our previous study also showed that Rps18A and Rps18B were associated with different sets of snoRNAs, which suggested that there could be functional differences between Rps18 paralogs.

The cellular growth experiments indicated that yeast cells require the presence of at least one of the *RPS18* paralog (Figure 3.1). Deletion of either of the *RPS18* paralogs reduces growth rate indicating that the remaining paralog cannot compensate for the absence of the other one. Moreover, when the remaining paralog is overexpressed from the strong GAL1 promoter, growth rate does not reach that of wild-type cells (Figure 3.1C). The results of growth experiments led us to investigate the polysome profiles of the *rps18* deletion strains. As expected, deletion of either *RPS18A* or *RPS18B* leads to abnormal polysome profiles. In both cases, there was a significant increase in the 60S peak and a slight decrease of the 40S peak and the polysomes but no major effect on 80S ribosomes. The largest increase in the 60S peak was seen when *RPS18A* was deleted, and was accompanied by a decrease in polysomes and in 80S ribosomes. Rps18 can form a bridge between the small and the large subunits of the ribosome through its interaction with RP L11 (Ben-Shem *et al.*, 2010). The absence of one copy of *RPS18* could hinder the proper assembly of the two ribosomal subunits and lead to the increased amount of free 60S subunits observed for both *rps18AΔ* and *rps18BΔ* strains. However, if association of the ribosomal subunits was affected, one would expect to see an increase of the 40S and

60S peaks, and concomitant decrease of 80S ribosomes, but this was not observed. Moreover, northern analyses indicated that there was no increase in steady-state levels of mature 25S rRNA and that 18S/25S rRNA ratios were practically unchanged (Figure 3.3), which is not consistent with a possible accumulation of free 60S subunits. Therefore, the increase of the 60S peak could reflect the accumulation of a pre-ribosomal complex that also sediments at 60S. This complex could likely be a small subunit intermediate since deletion of one copy of *Rps18* leads to an important increase of 21S pre-rRNA levels (Figure 3.3; lanes 7-8).

We proposed that differences in expression levels of the identical RPs S18A and S18B could account for their functional differences (Lemay *et al.*, 2011). Analysis of mRNAs indicated that *RPS18A* is more highly expressed than *RPS18B* in wild type cells (Figure 3.2). We also showed that *RPS18A* and *RPS18B* are regulated differently: expression of *RPS18A* is increased when *RPS18B* is removed whereas the absence of *RPS18A* has no effect on expression of *RPS18B* mRNA. Interestingly, deletion of *RPS18A* had a more deleterious effect, as observed on the polysome profiles. The fact that no major decrease in 80S ribosomes can be seen is consistent with the observation that deletion strains *rps18A* Δ and *rps18B* Δ can still grow relatively well (Figure 3.1B).

It was previously shown that absence of Rps18 leads to defects in early cleavages of pre-rRNA and 18S rRNA production (Ferreira-Cerca *et al.*, 2005 ; Léger-Silvestre *et al.*, 2004). Since these authors only used the ORF encoding Rps18B in their constructs, they could not determine if the phenotype observed was due to the removal of *RPS18A* or *RPS18B*. Here we showed that deletion of either *RPS18A* or *RPS18B* leads to slightly different pre-rRNA processing defects (Figure 3.3). Optimal cleavage at sites A0, A1 and A2 requires the presence of both Rps18A and Rps18B proteins; as seen in Figure 3.3, deletion of one copy of *RPS18* leads to delays in A2 cleavage. However, when we compare the two *RPS18* deletion strains, we note that accumulation of 35S, 32S, 23S and 21S pre-rRNAs is greater when *RPS18B* is deleted (Figure 3.3). This suggests that Rps18B protein is more implicated in rRNA processing than Rps18A. Interestingly, when *RPS18B* is removed (*rps18BΔ* strain) there is a significant accumulation of 20S pre-rRNA when cells were grown in galactose-containing medium (Figure 3.3). No similar accumulation could be observed in *rps18AΔ* strain. The accumulation of 20S pre-rRNA usually reflects defects in pre-rRNA nuclear export, as described by Ferreira-Cerca *et al.*, (2005). The export of 20S pre-rRNA was analyzed by fluorescence microscopy for both *rps18AΔ* and *rps18BΔ* strains grown in galactose-containing media, but no accumulation of 20S in the nucleus could be detected (D. Zenklusen, personal communication). Since 18S rRNA is still readily produced under these growth conditions, 20S accumulation might reflect delays in cleavage at site D in the cytoplasm. The accumulation of 20S pre-rRNA witnessed in *rps18BΔ* strain might also be due to the slower metabolism in

galactose-containing media. Nonetheless, processing defects are more important in *rps18BΔ* strain, which might indicate a greater role for Rps18B in rRNA maturation.

RACE experiments and sequence analyses for both *RPS18* paralogs highlighted differences between the two genes. Though they have the same type of promoter and UAS, the distance of these elements from the transcription start site varies for each paralog. The 5' UTR of *RPS18A* and *RPS18B* are very short but they vary in sequence. The sequence of their intron and their 3' UTR also vary, with a shorter intron and longer 3' UTR found in *RPS18B*. The position and distance between the poly(A) signal and its related sequences (efficiency element and positioning element) also vary for each paralog. The sequence differences could explain the variation in expression levels observed for *RPS18A* and *RPS18B* (Figure 3.1E). Differences in transcription rate or mRNA stability could account for these differences.

We showed that the two genes encoding S18 are expressed differently, that the deletion of one paralog is not compensated by overexpression of the other paralog, and that the two identical Rps18 paralogs have different functions. These findings are in accordance with the idea of paralog-specific functions in yeast cells. Rps18B appears to be more important for pre-rRNA processing. The observed differences in expression levels could explain the functional variances between the two Rps18 paralogs, although post-translational modifications (like acetylation,

methylation or sumoylation) could also account for these phenotypic differences. A detailed analysis of possible post-translational modifications will be required to sort this out. Finally, we showed through RACE experiments and sequence analyses that *RPS18A* and *RPS18B* genes and mRNAs are quite different.

3.6 MATERIALS AND METHODS

3.6.1 Yeast strains,

The strains used in this study are: BY4741 (*MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*), *rps18A Δ* (BY4741, *rps18A Δ ::kanMX6*), *rps18B Δ* (BY4741, *rps18B Δ ::kanMX6*), PGAL-S18B/A Δ (*rps18A Δ* , *PGAL1-RPS18B::his3MX6*), PGAL-S18A/B Δ (*rps18B Δ* , *PGAL1-RPS18A::his3MX6*), RPS18A-HA (BY4741, *RPS18A-3HA::his3MX6*), RPS18B-HA (BY4741, *RPS18B-3HA::his3MX6*), PGAL-S18A/BHA (RPS18B-HA, *PGAL1-RPS18A::kanMX6*), PGAL-S18B/AHA (RPS18A-HA, *PGAL1-RPS18B::kanMX6*)

3.6.2 Spot assays and growth curves

Yeast strains were grown and maintained in exponential phase in rich media, YPD or YPGal, or in appropriate selective media SD or SGal, when required (Lemay *et al.*, 2011). Yeast transformation was carried out as described (Gietz *et al.*, 1992). Strains *rps18A Δ* and *rps18B Δ* , and strains RPS18A-HA and RPS18B-HA expressing

triple HA-tagged Rps18A/B under the control of their natural promoter were modified to express Rps18A/B under the control of the GAL1 promoter (Longtine *et al.*, 1998). Spot assays and growth curves were carried out at 30°C as described (Lemay *et al.*, 2011). For spot assays, 10-fold dilutions were spotted on YPD or YPGal plates and grown for 3-4 days. For growth curve in galactose-containing media, cells were resuspended to an OD of 0.1 at 600nm in YPGal pre-warmed at 30°C instead of YPD.

3.6.3 Sucrose density gradients

Linear 7-47% sucrose density gradients were carried out with 8 A₂₅₄ units of whole cell extracts (Lemay *et al.*, 2011). Gradients were analyzed with an ISCO gradient fractionator system coupled to a UA-6 detector to produce continuous absorbance profiles at 254 nm.

3.6.4 Immunoprecipitations

Cells were grown in YPGal or YPD to exponential phase ($A_{600} \approx 0.5$) and harvested by centrifugation. IPs were done with 25 OD of cells as described (Lemay *et al.*, 2011) except that the pre-cleared cell extracts were incubated with 50 μ l of protein A agarose beads (Roche) coupled to mouse 12CA5 anti-HA monoclonal antibody (mAb).

3.6.5 RNA and protein analyses

RNA and protein analyses were done essentially as described (Lemay *et al.*, 2011). For northern analyses of snoRNAs and mRNAs, samples were separated on 6 or 8% polyacrylamide urea gels. To analyze large RNAs, equal amounts (10 µg) of total RNA isolated by the hot-phenol technique (Ausubel *et al.*, 1999) were loaded in each lane and separated on 1,2% formaldehyde-agarose gels. Oligonucleotide probes used for northern analyses are described below. RACE experiments were done with SMARTer™ RACE cDNA amplification kit (Clontech) according to manufacturer's recommendations. Protein analyses were carried out by electrophoresis on 10% polyacrylamide-SDS gels and western blotting was done with anti-HA mouse mAb 12CA5 diluted 1/1000.

3.6.6 Oligonucleotides

The oligonucleotides used for northern blot analyses of mRNAs and small RNA are: RPS18 mRNA (5'-GTG TTC AAC AAA CGT AAA ATG TTG G-3'), Anti-SCR1 (5'-CCC ACC AGA AAG CCA TTA CAG CC-3'), Anti-snr4 (5'-AAG GCC ACG GCA CAA TCC AC-3'), Anti-snr10 (5'-CAA TCC TTG CAA CGG TCC TCA TCC-3'), Anti-snr30 (5'-GGA ATA TAC TGC GGT AGG ACG AAC-3'), Anti-snr35 (5'-TGA TGA TCT CTC CGA TGG AC-3'), Anti-snr37 (5'-GAG CAA GCT CCT CAT CAC TC-3'), Anti-snr84 (5'-GAG TCA TGT TCC TTA GCT TCT TT-3'), Anti-U3 (5'-CCA AGT TGG ATT CAG TGG CTC-3'), Anti-U14 (5'-CGA TGG GTT CGT AAG CGT ACT CCT ACC GTG G-3'), Anti-U24 (5'-GGT

ATG TCT CAT TCG GAA CTC AAA GTT C-3'). The following oligonucleotides were used to detect pre-rRNA precursors: 5'-A0 (5'-CGC TGC TCA CCA ATG G-3'), A2-A3 (5'-TTG TTA CCT CTG GGC CC-3'), D-A2 (5'-GCT CTT TGC TCT TGC C-3'), 25S (5'-CTC CGC TTA TTG ATA TGC-3'), 18S (5'-CAT GGC TTA ATC TTT GAG AC-3'). The oligonucleotides required for RACE analyses are as follows: 5'-RACE GSP S18A (5'-CCC GGA TCC AAA AAA GAT TAA GCT TGA ATA ATC TTA TCA G-3'), 5'-RACE GSP S18B (5'-CCC GGA TCC GTA CAA TTA TTA CTG ATA ATT TCC TTA ATT GA-3'), 3'-RACE GSP S18A (5'-CTG ATA AGA TTA TTC AAG CTT AAT CTT TTT TG-3'), 3'-RACE GSP S18B (5'-TCA ATT AAG GAA ATT ATC AGT AAT AAT TGT AC-3')

3.7 ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Karen Wehner and Susan Baserga for the 12CA5 mAb, to Daniel Zenklusen for unpublished FISH experiments, and to Ann Beyer, Sherif Abou Elela and Sahar Soltanieh for critical reading of the manuscript. We also thank Sophie Museux, Marie Cueff and Aline Thonn for technical assistance. This work was supported by a grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN 249792) to FD.

3.8 FIGURE LEGENDS

Figure 3.1. *RPS18* is essential for optimal growth and ribosomal function. A) Ten-fold dilutions of exponentially growing cells were spotted from left to right on YPGal (left panel; Galactose) or YPD (right panel; Dextrose) plates. BY4741 is the parental wild-type strain (WT) from which were generated deletion strains *rsp18AΔ* and *rsp18BΔ*. The deletion strains were used to generate PGAL-S18B/AΔ and PGAL-S18A/BΔ strains, where the remaining copy of *RPS18* is under the control of the GAL1 promoter. Growth in liquid media after the shift from YPGal to YPD (B) and after transfer from YPGal to fresh YPGal (C) was monitored for 24h. D) Sedimentation profiles of ribosomal particles. Cellular extracts of exponentially growing cells were fractionated on linear sucrose gradients. Extracts were prepared from wild-type BY4741 (WT; black line), *rsp18AΔ* (broken line) and *rsp18BΔ* (dotted grey line) strains. Profiles were obtained by continuous reading of the absorbance at 254 nm. Peaks of ribosomal subunits, 80S ribosomes and polysomes are indicated. E) Expression levels of *RPS18* mRNAs. Total RNA (10 μg) isolated from wild-type strain BY4741, deletion strains *rsp18AΔ* and *rsp18BΔ* (*S18B/A*; lanes 2 and 5 respectively) and depletion strains PGAL-S18A/BΔ and PGAL-S18B/AΔ grown in galactose (GAL) or dextrose (DEX) for 12 hours was analyzed by northern hybridization. Only the mature *S18* mRNAs were detected. As loading control, a probe to detect the SRP RNA (SCR1) was hybridized on the same blot.

Figure 3.2. Association of Rps18A and Rps18B with snoRNAs. A) RNAs recovered from whole cell extracts (T; 1% input) and immunoprecipitates (P) were detected by northern hybridization. The HA-tagged paralog is identified at the top. The untagged paralog is either under the control of its natural promoter (*S18A/B*) or the GAL1 promoter that is activated (GAL) or repressed (DEX). Untagged BY4741 strain served as a negative control to determine the background levels of immunoprecipitated snoRNAs, which are indicated on the right of each panel. The asterisk (*) indicates blots with multiple bands: snR84 is the bottom band, U3 is the bottom band and snR35 is the top band. B) HA-tagged Rps18A or Rps18B was isolated by IP. Cellular extracts (T; 10% input) and isolated proteins (P) were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting using anti-HA 12CA5 mAb. The untagged paralog is either under the control of its natural promoter (*S18A/B*) or the GAL1 promoter. The light chain (LC) from HA antibody was detected.

Figure 3.3. Absence of Rps18A or Rps18B affects pre-rRNA processing. Total RNA from identified strains was separated on a denaturing agarose gel. A schematic representation of the 35S precursor with all the cleavage sites is presented at the top right (not to scale). The different rRNA precursors (represented on the right) were detected by northern hybridization with oligonucleotide probes (black lines).

Figure 3.4. Schematic representation of *RPS18* genes and their mRNA products. A) *RPS18A* and *RPS18B* mRNAs. The 5' and 3' ends of both mRNAs were identified by RACE. The 5' UTR sequence is shown; nucleotides in bold are conserved between the two *RPS18* paralogs. The position and sequence of possible efficiency element (EE), positioning element (PE) and polyadenylation signal [poly(A)] were obtained by sequence analyses. B) Promoter region of *RPS18A* and *RPS18B*. Upstream activation sequences HOMOL1 and RPG box are indicated. Possible GA element of the promoter is shown. Arrows represent the transcription start site. The position of the initiation codon is indicated (AUG...).

Figure 3.2

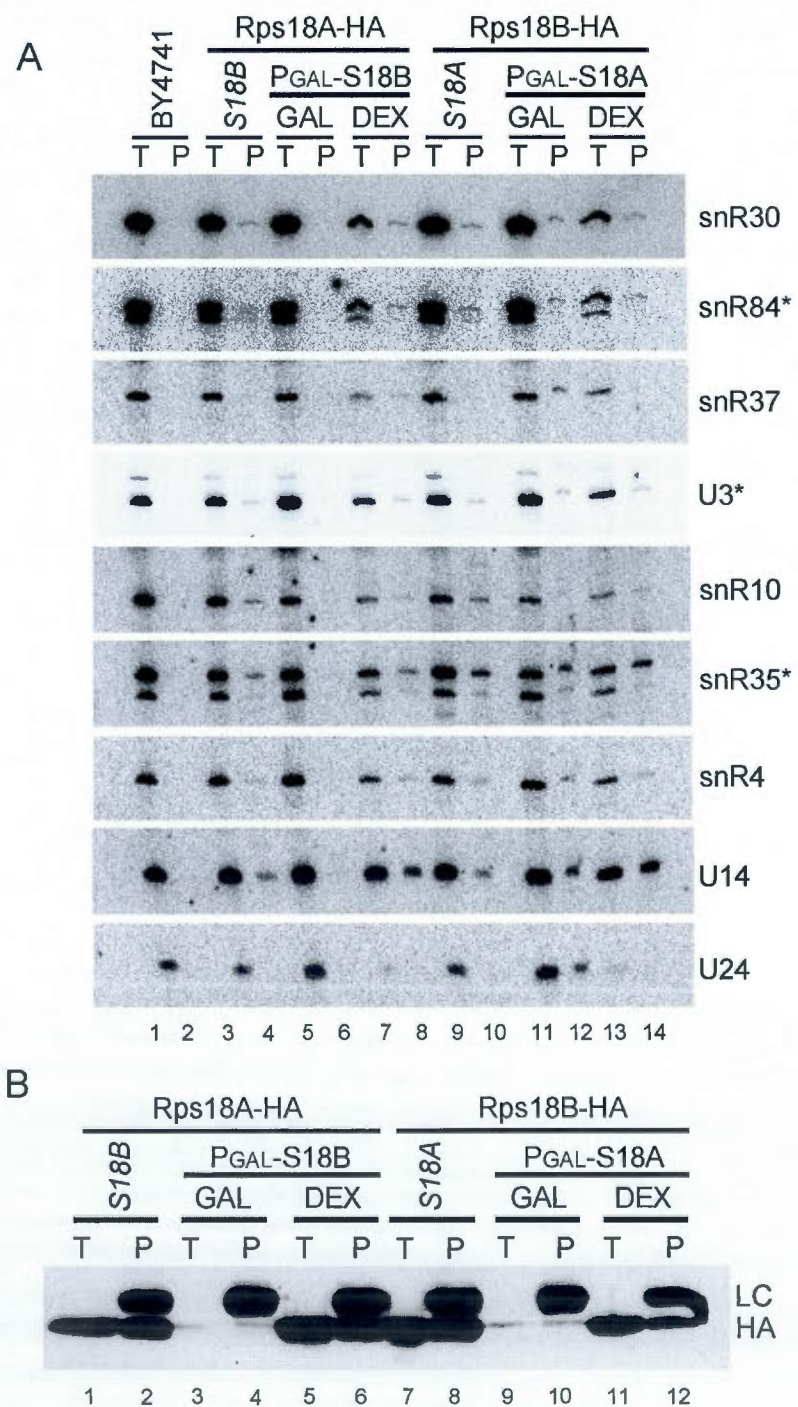


Figure 3.3

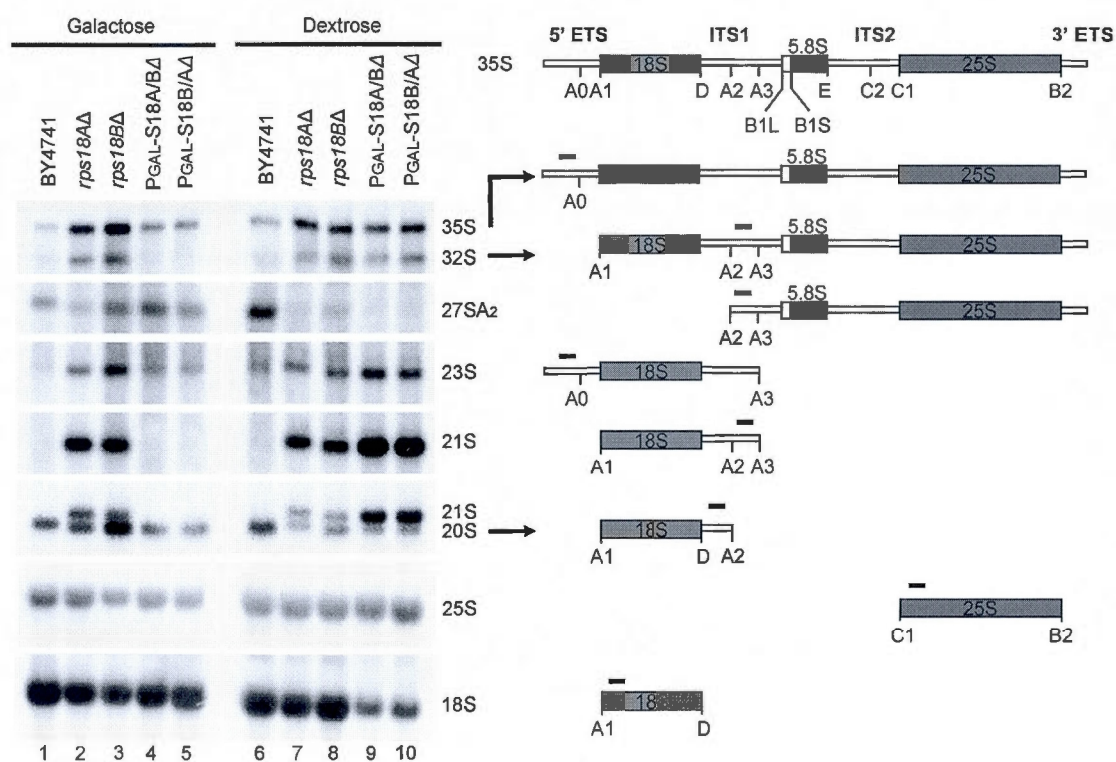
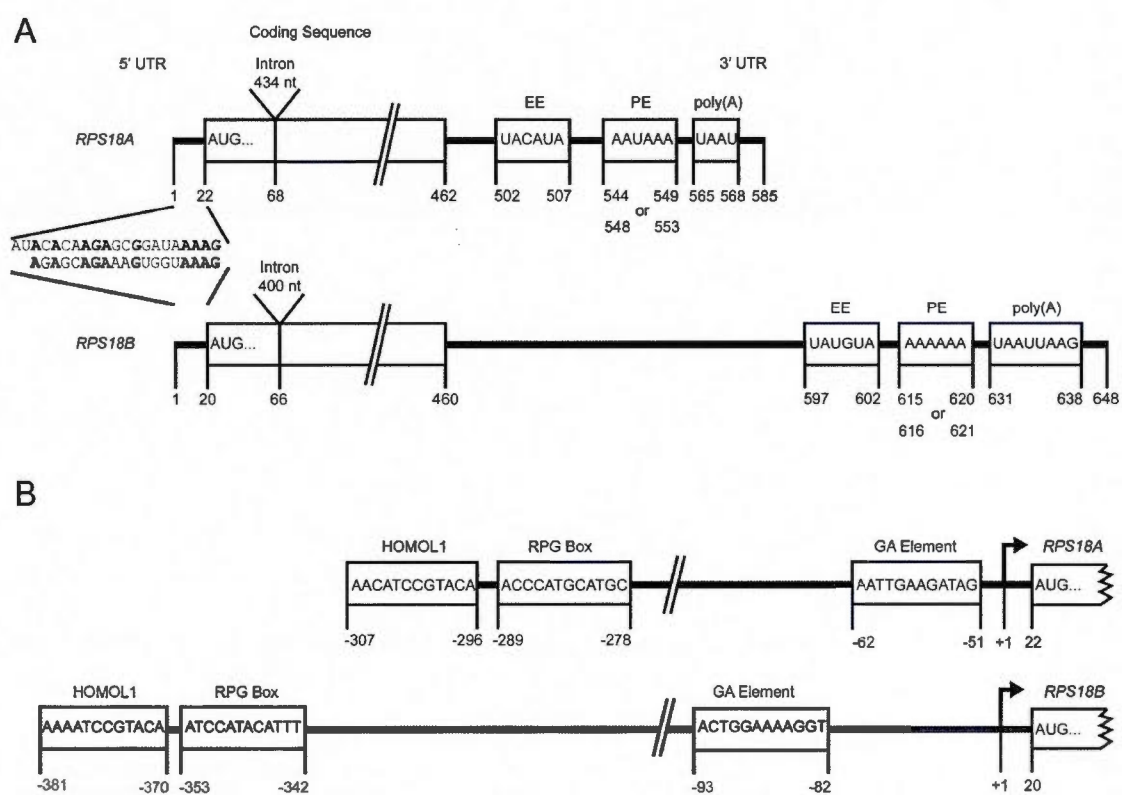


Figure 3.4



CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les ribosomes, complexes ribonucléoprotéiques responsables de la synthèse des protéines, se retrouvent dans toutes les cellules appartenant aux trois domaines de la vie (bactéries, archées et eucaryotes). La synthèse de ribosomes peut constituer jusqu'à 80% du travail d'une cellule en prolifération (Schmidt, 1999). De plus, la production de ribosomes et la régulation de la croissance cellulaire sont interreliées (Jin, Cagliero et Zhou, 2012 ; Klumpp et Hwa, 2009 ; Perry, 2007). Ceci montre l'importance capitale de la production de ribosomes pour les cellules, plus particulièrement celles dont le taux de croissance est élevé.

Comme mentionné précédemment, la synthèse d'ARNr, composante principale des ribosomes, requiert au moins 170 facteurs protéiques, dont différentes exonucléases et endonucléases ainsi que des ARN hélicases (Fromont-Racine *et al.*, 2003 ; Kressler, Linder et de La Cruz, 1999 ; Venema et Tollervey, 1999). Même si la majeure partie des éléments nécessaires à la maturation des ARNr a été identifiée, comment ces éléments interagissent afin de produire des ARNr matures reste encore à être élucidé. L'identification du contenu protéique de snR30, la caractérisation des protéines qui y sont associées et une étude plus approfondie du rôle de snR30 dans la maturation de la petite sous-unité du ribosome permettent de répondre à plusieurs questions qui jusqu'à maintenant étaient sans réponse. Comment snR30 participe aux clivages aux sites A0, A1 et A2? Comment snR30 interagit avec les autres composantes du SSU processome? Quelles fonctions ont les protéines associées à snR30 dans la maturation des ARNr et quelle est leur relation par rapport à snR30? Mon projet de thèse a permis de répondre en partie à certaines de ces questions tout en fournissant des pistes de réponses pour d'autres de ces questions. Une meilleure compréhension du mécanisme de biogenèse des ribosomes pourrait permettre le

développement de traitements ou de méthodes efficaces de dépistage pour les ribosomopathies décrites précédemment (voir section 1.1.10). Une fois la biogenèse des ribosomes déchiffrée, ceci pourrait faciliter le développement d'outils moléculaires tels que la formation de ribosomes artificiels capables d'incorporer des aa non naturels à des protéines (Wang, Schmied et Chin, 2012)

4.1 La snoRNP snR30.

Jusqu'à tout récemment, aucune protéine spécifique à snR30 (protéine qui n'interagit qu'avec snR30 et aucun autre ARN) n'avait été trouvée. Le système de purification mis au point pour isoler snR30 nous a permis d'identifier plusieurs protéines et de confirmer l'association des protéines Nop6, Rps9A/B, Rps18A/B, Htb1/2 et Hhf2 avec snR30 en plus des quatre protéines H/ACA déjà connues. Aucune de ces protéines n'est spécifique à snR30. Cependant, elles sont toutes associées à des snoRNA, ce qui suggère un rôle pour ces protéines dans la biogenèse des ribosomes. Même si ces travaux de recherche précisent le rôle de snR30 dans la maturation des ARNr, plusieurs questions restent encore à être élucidées. Comme nous l'avons démontré, la snoRNP snR30 est essentielle aux clivages aux sites A0, A1 et A2 dans le pré-ARNr 35S (Figure 2.8) et à la formation du SSU processome (Figure 2.9). La purification de la snoRNP snR30 a été tentée à plusieurs reprises et plusieurs protéines ont été identifiées comme étant associées à snR30 dont la protéine Has1 en plus des protéines que nous avons identifiées (Lemay *et al.*, 2011 ; Liang et Fournier, 2006 ; Lübben *et al.*, 1995 ; Watkins *et al.*, 1998). Ce n'est que récemment que deux protéines spécifiques à snR30 ont pu être identifiées, soit Utp23 et Kri1 (Hoareau-Aveilla *et al.*, 2012). À l'exception des quatre protéines H/ACA, aucune protéine découverte par ces autres groupes n'a été retrouvée lors de nos analyses. Ceci pourrait être dû à des différences au niveau des méthodes d'extractions et de purification, des « tag » d'ARN utilisés et de l'endroit où ces séquences sont introduites dans snR30. Afin de trouver des protéines spécifiques à snR30, plusieurs possibilités auraient pu être envisagées. D'abord, il nous aurait été possible

d'introduire l'aptamère S1 à un autre endroit dans la séquence de snR30. Ceci permettrait d'identifier des protéines qui s'associent à snR30 près du site où nous avons introduit l'aptamère et qui auraient été délogées par ce dernier. Ensuite, l'utilisation de la version complète de l'aptamère S1 plutôt que la version minimale aurait pu améliorer le rendement du système de purification et permettre l'identification d'autres protéines que nous n'avons pas détectées. Enfin, le pontage de protéines à snR30 avant la purification pourrait permettre de trouver des protéines dont l'interaction avec snR30 est transitoire.

4.2 snR30 et les histones.

L'assemblage du SSU processome se fait de façon modulaire (Perez-Fernandez, Martin-Marcos et Dosil, 2011). Cependant, les méthodes utilisées pour construire la carte d'assemblage du SSU processome n'ont pas permis de cerner à quel moment snR30 s'associe au SSU processome. Comme nos résultats montrent une association entre snR30 et les histones H2B et H4, on peut supposer que snR30 s'associe très tôt au début de la transcription de l'ARNr et de l'assemblage du SSU processome. Les histones H3 et H4 sont associées avec les gènes d'ARNr activement transcrits puisqu'elles font partie du UAF, facteur de transcription requis pour l'ARN polymérase I (Tongaonkar *et al.*, 2005). Le rôle des histones H2B et H4 dans la maturation des ARNr reste vague et un travail de caractérisation serait nécessaire pour mieux comprendre leur fonction dans la synthèse de ribosomes. Le snoRNA snR30 pourrait servir de chaperone en faisant le lien entre la transcription de l'ARNr et les clivages précoces du pré-ARNr grâce à son interaction avec les histones. Les histones pourraient aussi permettre le recrutement de snR30 au SSU processome. Qui plus est, l'association des histones H2B et H4 avec différents snoRNA suggère que le rôle des histones dans la maturation des ARNr ne se limite pas à l'initiation de la transcription de l'ADNr. Les améliorations au niveau de techniques telles que le « single molecule fluorescence resonance energy transfer » (smFRET) (Chen *et al.*, 2012) pourraient permettre d'élucider à quel moment snR30 est recruté au SSU

processome par rapport à des composantes du SSU processome dont l'ordre d'assemblage est déjà connu.

4.3 La protéine nucléolaire Nop6.

La protéine Nop6 est l'une des protéines associées à snR30 que nous avons identifiée. En plus de confirmer sa localisation nucléolaire (Figure 2.5), nos résultats indiquent que l'absence de Nop6 réduit l'efficacité de clivage au site A2 (Figure 2.8). Nous avons aussi montré que la protéine Nop6 est fortement associée au snoRNA snR35 (Figure 2.4). Ce snoRNA est responsable de la pseudouridylation de l'uridine 1191 de l'ARNr 18S (Liang, Liu et Fournier, 2009). Nep1 va ensuite méthyler la pseudouridine 1191 de l'ARNr 18S (Wurm *et al.*, 2010). Les travaux de Buchhaupt, Kotter et Entian, (2007) montrent que la délétion de Nop6 agit comme suppresseur de défauts de fonctionnement de la protéine Nep1. L'absence de Nop6 pourrait avoir un effet sur la structure de l'ARNr près de U/Ψ1191. De telles modifications au niveau de la structure de l'ARNr diminueraient l'efficacité de clivage au site A2. Des changements dans la structure de l'ARNr 18S expliqueraient pourquoi des mutations dans Nop6 permettent aux cellules de tolérer les mutations dans la protéine Nep1.

Des travaux récents de Schilling *et al.* montrent un lien génétique entre Nep1 et la protéine Rps18, que nous avons identifiée comme étant associée à snR30 (Schilling *et al.*, 2012). Les auteurs suggèrent que les protéines Nep1 et Utp30, une protéine spécifique au snoRNA U3, agissent ensemble pour permettre la liaison de Rps18. Ceci permettrait l'incorporation de la protéine Rps19 et ce, avant le clivage au site A2. Il semble y avoir un lien entre les snoRNP snR30 et snR35, les protéines Nep1, Nop6, Rps18 et Rps19, la U/Ψ1191 ainsi que le clivage au site A2. Des outils tels que le hSHAPE (highthroughput selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension), le « time-resolved footprinting » et le PARS (parallel analysis of RNA structure) combinées avec des études par résonance magnétique nucléaire

(RMN) pourraient nous aider à mieux comprendre les changements de structure qu'imposent à l'ARNr la modification de U1191 en Ψ 1191, la méthylation de Ψ 1191 par Nep1 ainsi que l'association de snR30, snR35, Nep1, Nop6, Rps18 ou Rps19 à l'ARNr (Fourmy et Yoshizawa, 2012). La méthode de hSHAPE utilise des réactifs qui vont modifier le squelette sucre-phosphate dans les régions plus flexibles de la molécule. Les sites de modifications sont déterminés par extension d'amorces ce qui permet d'obtenir, au nucléotide près, un modèle de structure secondaire très précis. Le « time-resolved footprinting » permet d'obtenir des « clichés » de la structure d'un ARN à des intervalles de 10 à 20 millisecondes. L'accessibilité du squelette sucre-phosphate est déterminée par sa susceptibilité à être clivée par des radicaux hydroxyles. Le profil de fragmentation de l'ARN pour chaque intervalle de temps est obtenu par séquençage ce qui permet d'identifier quelles portions de l'ARN a changé de structure depuis le début de la réaction. Le PARS permet d'obtenir en une seule expérience la structure secondaire de milliers d'ARN au nucléotide près. Pour cette méthode, les ARN sont clivés avec les RNases S1 ou V1 indépendamment, les sites de clivages sont détectés grâce à la ligation d'un adaptateur suivi de séquençage à haut débit. Le nombre de fragments obtenus pour chaque base indique les coupures avec la RNase S1 ou V1, ce qui permet de déterminer si la base est dans une portion simple brin (coupée avec la RNase S1) ou double brin (coupée avec la RNase V1).

4.4 Les protéines ribosomiques Rps9 et Rps18.

Parmi les protéines nouvellement identifiées qui sont associées à snR30, on dénombre deux protéines ribosomiques, soit Rps9 et Rps18. Toutes deux sont conservées au cours de l'évolution et ont un homologue chez la bactérie *E. coli*: les protéines ribosomiques S4 et S13 respectivement (Planta et Mager, 1998). Ces deux protéines, comme la plupart des protéines ribosomiques chez *S. cerevisiae*, sont exprimées à partir de gènes dupliqués. Les protéines Rps9A et Rps9B ont une

séquence en aa presque identique tandis que Rps18A et Rps18B partagent exactement la même séquence en aa. Le fait que ces protéines soient associées à snR30 ainsi que plusieurs autres snoRNA suggère que Rps9 et Rps18, en plus d'être des composantes de la petite sous-unité du ribosome, pourraient avoir un rôle à jouer dans la maturation des ARNr. Nous avons aussi montrée que ces protéines n'interagissent pas avec les mêmes snoRNA, ce qui suggère que chaque copie de ces protéines possède des différences fonctionnelles (Figure 2.4). Ces différences fonctionnelles pourraient être attribuables à des niveaux d'expression différents pour chacun des paralogues. Des modifications post-traductionnelles spécifiques pour chaque paralogue pourraient aussi expliquer les disparités observées.

Une étude plus approfondie des gènes *RPS18A* et *RPS18B* nous a permis de mettre en évidence plusieurs différences entre ces deux gènes produisant des protéines identiques. Lorsqu'une des deux copies de Rps18 est enlevée, ceci réduit le taux de croissance des cellules, ce qui indique que la présence de l'autre copie ne parvient pas à elle seule à compenser l'absence de la première copie (Figure 3.1). De plus, même lorsque la copie restante de Rps18 est surexprimée, la croissance cellulaire n'est pas restaurée à son niveau initial. Aussi, l'absence d'une copie de Rps18 mène à une forte augmentation du pic de 60S et cette augmentation est plus marquée lorsque Rps18A est absente. Ceci supporte l'idée que Rps18A et Rps18B ont des rôles différents dans la cellule. Nos résultats indiquent aussi que la régulation de l'expression de *RPS18A* et *RPS18B* est différente. De façon plus détaillée, lorsque nous retirons *RPS18B*, l'expression de l'ARNm de *RPS18A* est augmentée tandis que l'absence de *RPS18A* n'a pas d'effet sur l'expression de *RPS18B*. Nos analyses ont permis aussi de montrer que les protéines Rps18A et Rps18B sont requises afin d'avoir une efficacité de clivage optimale aux sites A0, A1 et A2. Cependant, l'absence de Rps18B mène à une plus forte accumulation des pré-ARNr 35S, 32S, 23S et 21S comparée à l'absence de Rps18A (Figure 3.3). Ces résultats suggèrent que la protéine Rps18B est plus impliquée dans la maturation de l'ARNr tandis que

Rps18A a un rôle plus important en tant que constituant de la petite sous-unité du ribosome.

Afin d'identifier les éléments responsables des différences d'expression entre les gènes *RPS18A* et *RPS18B*, nous avons effectué des analyses de séquences. D'abord, les motifs en amont (HOMOL1 et boîte RPG) et les promoteurs sont très similaires. Cependant, la distance qui sépare ces éléments du site d'initiation de la transcription varie grandement entre *RPS18A* et *RPS18B*. Les régions non-traduites (UTR) en 5' de ces deux gènes sont toutes deux assez courtes (19 et 21 nt respectivement) mais les séquences ont peu de ressemblances. Les séquences de l'intron et du 3' UTR sont beaucoup plus variables : l'intron de *RPS18B* est plus court tandis que son 3' UTR est plus long. De plus, la position et la distance du signal de polyadénylation et des séquences associées (élément d'efficacité et élément de positionnement) est très variable entre ces deux gènes. Des modifications au niveau de l'intron ont des effets similaires sur l'expression des gènes *RPS18A* et *RPS18B* (Parenteau et al., 2011). De plus, les niveaux d'expression des protéines Rps18A et Rps18B sont semblables lorsque leur 5' UTR est modifié (Komili *et al.*, 2007). Ceci suggère que les variations d'expression observées entre ces deux gènes découlent d'éléments situés dans le 5' UTR. Une analyse détaillée des 5' et 3' UTR ainsi que des promoteurs devra être effectuée afin de bien définir les éléments qui régulent l'expression des protéines Rps18A et Rps18B. La construction de chimères exprimant, par exemple, l'un ou l'autre des UTR (5' ou 3', de Rps18A ou Rps18B) devrait être envisagée pour étudier les UTR des ARNm produisant ces deux protéines. Afin de définir le mode de régulation de ces deux gènes, il serait possible d'utiliser des gènes rapporteurs tel le gène de la luciférase ainsi que des analyses bioinformatiques avec des programmes tels que RegRNA (Huang *et al.*, 2006).

Il a été démontré que la protéine ribosomique Rps9 fait partie intégrante du SSU processome (Bernstein *et al.*, 2004). Nous montrons que la protéine Rps9 peut

être associée à plusieurs snoRNA, ce qui suggère que le SSU processome ne contient pas seulement la snoRNP U3 mais aussi certaines snoRNP impliquées dans les modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr. Comme Rps18, la protéine Rps9 est exprimée à partir de gènes dupliqués qui génèrent deux protéines presque identiques. Pareillement à Rps18A et Rps18B, Rps9A et Rps9B pourraient avoir des rôles différents dans la cellule. Les différences entre Rps9A et Rps9B se retrouvent principalement dans une portion acide à l'extrémité C-terminale de la protéine. Cette portion acide serait requise pour la terminaison de la traduction et des modifications dans cette portion de la protéine entraînent des changements au niveau de l'association des ribosomes avec plusieurs ARNm (Pnueli et Arava, 2007). Ceci suggère que chez *S. cerevisiae*, l'incorporation de Rps9A ou Rps9B dans le ribosome déterminerait quels ARNm sont traduits par les ribosomes contenant l'une ou l'autre de ces protéines. Il pourrait donc y avoir un « code ribosomique » qui régulerait l'expression de certains gènes selon quelles copies des protéines ribosomiques sont incorporées dans le ribosome. De plus, des travaux récents indiquent que l'expression de Rps9 serait autorégulée (Plocik et Guthrie, 2012). Les auteurs suggèrent que l'autorégulation de Rps9 aurait évolué d'un mécanisme d'autorégulation par l'expression d'un gène dupliqué chez la levure à une autorégulation par épissage alternatif chez les eucaryotes supérieurs. Ceci indique que le « code ribosomique » chez les eucaryotes supérieurs serait dépendant de l'épissage alternatif des gènes encodant les protéines ribosomiques. Afin de comprendre ce « code ribosomique », il pourrait être envisageable de purifier des ribosomes contenant l'une ou l'autre des copies d'une protéine ribosomique dupliquée et regarder quels ARNm sont associés à ces ribosomes. Par exemple, nous pourrions exprimer Rps18A en fusion avec un épitope de purification, isoler les polysomes sur un gradient de sucrose, purifier les ribosomes associées à Rps18A et identifier quels ARNm sont traduits par ces ribosomes grâce à des analyses de micropuces d'ADN. La même analyse serait ensuite effectuée sur des ribosomes associés à Rps18B.

4.5 Conclusions générales.

Le snoRNA snR30 fait partie de la grande famille des snoRNA H/ACA. Comme tous les membres de cette famille, snR30 adopte la structure classique des snoRNA H/ACA et est associé aux quatre protéines communes à cette famille. Contrairement aux autres snoRNP H/ACA qui sont impliquées dans les réactions de pseudouridylation, snR30 est plutôt nécessaire aux réactions de clivage du pré-ARNr 35S menant à la formation de l'ARNr 18S. Mes travaux de recherche auront permis de contribuer à une meilleure compréhension de la fonction de snR30 dans la maturation des ARNr. Nous avons mis en évidence le rôle essentiel de snR30 dans la formation du SSU processome ainsi que dans les clivages aux sites A0, A1 et A2. Le développement d'une méthode de purification en deux étapes pour isoler snR30 nous a permis d'identifier plusieurs autres partenaires protéiques de snR30 qui n'avaient pas été identifiés auparavant. Nous avons pu démontrer que la protéine nucléolaire Nop6 est requise pour une efficacité de clivage optimale au site A2. Par ailleurs, mes travaux montrent que non seulement la protéine Rps18 est un constituant du ribosome, mais qu'elle est impliquée dans la maturation des ARNr. Finalement, mes résultats suggèrent que les protéines Rps18A et Rps18B ont des fonctions différentes dans la cellule. Mes travaux ont permis l'identification de nouveaux facteurs participant à la biogenèse des ribosomes et offrent une nouvelle perspective sur le SSU processome. L'ensemble de mes travaux suggère que le SSU processome ne se limite pas à la snoRNP U3 et ces protéines associées mais qu'il contient plusieurs autres protéines et snoRNP dont snR30. Des mutations dans la protéine Rps19 ont été identifiées chez des patients atteints de l'anémie de Diamond-Blackfan et des mutations dans la protéine Nep1 causent le syndrome de Bowen-Conradi. Comme il y a possiblement un lien entre Rps18, Nop6, Nep1 et Rps19, le snoRNA snR30/U17 et/ou ces protéines associées pourraient servir de cible thérapeutique pour ces deux ribosomopathies.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond et M. Mann. 2005. «Nucleolar proteome dynamics». *Nature*, vol. 433, no 7021, p. 77-83.
- Atzorn, V., P. Fragapane et T. Kiss. 2004. «U17/snr30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production». *Mol Cell Biol*, vol. 24, no 4, p. 1769-1778.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston et D.D. Moore (1999). Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology New York, John Wiley & Sons: 1104 p
- Bachellerie, J. P., J. Cavaillé et A. Huttenhofer. 2002. «The expanding snoRNA world». *Biochimie*, vol. 84, no 8, p. 775-790.
- Bachellerie, J. P., J. Cavaillé et L. H. Qu. 2000. «Nucleotide modifications of eukaryotic rRNAs: the world of small nucleolar RNA guides revisited.». In *The ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions.*, R. A. Garret, S. R. Douthwaite, A. Liljas, A. T. Matheson, P. B. Moore et H. F. Noller, p. 191-203. Washington, DC: ASM Press.
- Balakin, A. G., L. Smith et M. J. Fournier. 1996. «The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions». *Cell*, vol. 86, no 5, p. 823-834.
- Ballarino, M., M. Morlando, F. Pagano, A. Fatica et I. Bozzoni. 2005. «The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol*, vol. 25, no 13, p. 5396-5403.
- Bally, M., J. Hughes et G. Cesareni. 1988. «SnR30: a new, essential small nuclear RNA from *Saccharomyces cerevisiae*». *Nucleic Acids Res*, vol. 16, no 12, p. 5291-5303.
- Baudin-Baillieu, A., C. Fabret, X. H. Liang, D. Piekna-Przybylska, M. J. Fournier et J. P. Rousset. 2009. «Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy». *Nucleic Acids Res*, vol. 37, no 22, p. 7665-7677.

- Ben-Shem, A., L. Jenner, G. Yusupova et M. Yusupov. 2010. «Crystal structure of the eukaryotic ribosome». *Science*, vol. 330, no 6008, p. 1203-1209.
- Bernstein, K. A., J. E. Gallagher, B. M. Mitchell, S. Granneman et S. J. Baserga. 2004. «The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate». *Eukaryot Cell*, vol. 3, no 6, p. 1619-1626.
- Birbach, A., S. T. Bailey, S. Ghosh et J. A. Schmid. 2004. «Cytosolic, nuclear and nucleolar localization signals determine subcellular distribution and activity of the NF-kappaB inducing kinase NIK». *J Cell Sci*, vol. 117, no Pt 16, p. 3615-3624.
- Bohnsack, M. T., M. Kos et D. Tollervey. 2008. «Quantitative analysis of snoRNA association with pre-ribosomes and release of snR30 by Rok1 helicase». *EMBO Rep*, vol. 9, no 12, p. 1230-1236.
- Bousquet-Antonelli, C., Y. Henry, P. G'Elugne J, M. Caizergues-Ferrer et T. Kiss. 1997. «A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs». *EMBO J*, vol. 16, no 15, p. 4770-4776.
- Brown, J. W., M. Echeverria et L. H. Qu. 2003. «Plant snoRNAs: functional evolution and new modes of gene expression». *Trends in plant science*, vol. 8, no 1, p. 42-49.
- Buchhaupt, M., P. Kotter et K. D. Entian. 2007. «Mutations in the nucleolar proteins Tma23 and Nop6 suppress the malfunction of the Nep1 protein». *FEMS Yeast Res*, vol. 7, no 6, p. 771-781.
- Bystricky, K., T. Laroche, G. van Houwe, M. Blaszczyk et S. M. Gasser. 2005. «Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization». *J Cell Biol*, vol. 168, no 3, p. 375-387.
- Cahill, N. M., K. Friend, W. Speckmann, Z. H. Li, R. M. Terns, M. P. Terns et J. A. Steitz. 2002. «Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP». *EMBO J*, vol. 21, no 14, p. 3816-3828.
- Catez, F., M. Erard, N. Schaerer-Uthurralt, K. Kindbeiter, J. J. Madjar et J. J. Diaz. 2002. «Unique motif for nucleolar retention and nuclear export regulated by phosphorylation». *Mol Cell Biol*, vol. 22, no 4, p. 1126-1139.

- Cavaillé, J., M. Nicoloso et J. P. Bachellerie. 1996. «Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides». *Nature*, vol. 383, no 6602, p. 732-735.
- Chen, J., A. Tsai, A. Petrov et J. D. Puglisi. 2012. «Nonfluorescent quenchers to correlate single-molecule conformational and compositional dynamics». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no 13, p. 5734-5737.
- Choesmel, V., S. Fribourg, A. H. Aguisa-Toure, N. Pinaud, P. Legrand, H. T. Gazda et P. E. Gleizes. 2008. «Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder». *Hum Mol Genet*, vol. 17, no 9, p. 1253-1263.
- Darzacq, X., N. Kittur, S. Roy, Y. Shav-Tal, R. H. Singer et U. T. Meier. 2006. «Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells». *J Cell Biol*, vol. 173, no 2, p. 207-218.
- Dieci, G., M. Preti et B. Montanini. 2009. «Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility». *Genomics*, vol. 94, no 2, p. 83-88.
- Dragon, F., J. E. Gallagher, P. A. Compagnone-Post, B. M. Mitchell, K. A. Porwancher, K. A. Wehner, S. Wormsley, R. E. Settlege, J. Shabanowitz, Y. Osheim, A. L. Beyer, D. F. Hunt et S. J. Baserga. 2002. «A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis». *Nature*, vol. 417, no 6892, p. 967-970.
- Dragon, F., V. Lemay et C. Trahan (2006). snoRNAs: Biogenesis, Structure and Function., eLS.
- Dragon, F., V. Pogacic et W. Filipowicz. 2000. «In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs». *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 9, p. 3037-3048.
- Duan, J., L. Li, J. Lu, W. Wang et K. Ye. 2009. «Structural mechanism of substrate RNA recruitment in H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase». *Mol Cell*, vol. 34, no 4, p. 427-439.
- Dunbar, D. A., S. Wormsley, T. M. Agentis et S. J. Baserga. 1997. «Mpp10p, a U3 small nucleolar ribonucleoprotein component required for pre-18S rRNA processing in yeast». *Mol Cell Biol*, vol. 17, no 10, p. 5803-5812.

- Durant, P. C., et D. R. Davis. 1999. «Stabilization of the anticodon stem-loop of tRNA^{Lys},3 by an A+-C base-pair and by pseudouridine». *J Mol Biol*, vol. 285, no 1, p. 115-131.
- Emmott, E., et J. A. Hiscox. 2009. «Nucleolar targeting: the hub of the matter». *EMBO Rep*, vol. 10, no 3, p. 231-238.
- Fatica, A., M. Dlakic et D. Tollervy. 2002. «Naf1 p is a box H/ACA snoRNP assembly factor». *RNA*, vol. 8, no 12, p. 1502-1514.
- Fayet-Lebaron, E., V. Atzorn, Y. Henry et T. Kiss. 2009. «18S rRNA processing requires base pairings of snR30 H/ACA snoRNA to eukaryote-specific 18S sequences». *EMBO J*, vol. 28, no 9, p. 1260-1270.
- Ferreira-Cerca, S., G. Poll, P. E. Gleizes, H. Tschochner et P. Milkereit. 2005. «Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function». *Mol Cell*, vol. 20, no 2, p. 263-275.
- Filipowicz, W., et V. Pogacic. 2002. «Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 14, no 3, p. 319-327.
- Fourmy, D., et S. Yoshizawa. 2012. «Protein-RNA footprinting: an evolving tool». *WIREs RNA*.
- Freed, E. F., F. Bleichert, L. M. Dutca et S. J. Baserga. 2010. «When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis». *Mol Biosyst*, vol. 6, no 3, p. 481-493.
- Fromont-Racine, M., B. Senger, C. Saveanu et F. Fasiolo. 2003. «Ribosome assembly in eukaryotes». *Gene*, vol. 313, p. 17-42.
- Galardi, S., A. Fatica, A. Bachi, A. Scaloni, C. Presutti et I. Bozzoni. 2002. «Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro». *Mol Cell Biol*, vol. 22, no 19, p. 6663-6668.
- Gallagher, J. E., D. A. Dunbar, S. Granneman, B. M. Mitchell, Y. Osheim, A. L. Beyer et S. J. Baserga. 2004. «RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components». *Genes Dev*, vol. 18, no 20, p. 2506-2517.
- Ganot, P., M. L. Bortolin et T. Kiss. 1997. «Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs». *Cell*, vol. 89, no 5, p. 799-809.

- Ganot, P., M. Caizergues-Ferrer et T. Kiss. 1997. «The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation». *Genes Dev*, vol. 11, no 7, p. 941-956.
- Garcia-Gomez, J. J., R. Babiano, S. Lebaron, C. Froment, B. Monsarrat, Y. Henry et J. D. Cruz. 2011. «Nop6, a component of 90S pre-ribosomal particles, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *RNA Biol*, vol. 8, no 1, p. 112-124.
- Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods et R. H. Schiestl. 1992. «Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells». *Nucleic Acids Res*, vol. 20, no 6, p. 1425.
- Gillham, N. W., et J. E. Boynton. 1981. «Evolution of organelle genomes and protein-synthesizing systems». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 361, p. 20-43.
- Girard, J. P., C. Bagni, M. Caizergues-Ferrer, F. Amalric et B. Lapeyre. 1994. «Identification of a segment of the small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein GAR1 that is sufficient for nucleolar accumulation». *J Biol Chem*, vol. 269, no 28, p. 18499-18506.
- Henras, A., C. Dez, J. Noaillac-Depeyre, Y. Henry et M. Caizergues-Ferrer. 2001. «Accumulation of H/ACA snoRNPs depends on the integrity of the conserved central domain of the RNA-binding protein Nhp2p». *Nucleic Acids Res*, vol. 29, no 13, p. 2733-2746.
- Henras, A., Y. Henry, C. Bousquet-Antonelli, J. Noaillac-Depeyre, J.-P. Gélugne et M. Caizergues-Ferrer. 1998. «Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs». *EMBO J*, vol. 17, no 23, p. 7078-7090.
- Henras, A. K., J. Soudet, M. Gerus, S. Lebaron, M. Caizergues-Ferrer, A. Mougin et Y. Henry. 2008. «The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis». *Cell Mol Life Sci*, vol. 65, no 15, p. 2334-2359.
- Hernandez-Verdun, D. 2011. «Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle». *Nucleus*, vol. 2, no 3, p. 189-194.
- Hernandez-Verdun, D., P. Roussel et J. Gebrane-Younes. 2002. «Emerging concepts of nucleolar assembly». *J Cell Sci*, vol. 115, no Pt 11, p. 2265-2270.

- Hernandez-Verdun, D., P. Roussel, M. Thiry, V. Sirri et D. L. Lafontaine. 2010. «The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism». *WIREs RNA*, vol. 1, no 3, p. 415-431.
- Higuchi, R., B. Krummel et R. K. Saiki. 1988. «A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions». *Nucleic Acids Res*, vol. 16, no 15, p. 7351-7367.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. Hogue, D. Figeyes et M. Tyers. 2002. «Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry». *Nature*, vol. 415, no 6868, p. 180-183.
- Hoareau-Aveilla, C., E. Fayet-Lebaron, B. E. Jady, A. K. Henras et T. Kiss. 2012. «Utp23p is required for dissociation of snR30 small nucleolar RNP from preribosomal particles». *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no 8, p. 3641-3652.
- Hogg, J. R., et K. Collins. 2007. «RNA-based affinity purification reveals 7SK RNPs with distinct composition and regulation». *RNA*, vol. 13, no 6, p. 868-880.
- Huang, H. Y., C. H. Chien, K. H. Jen et H. D. Huang. 2006. «RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements». *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no Web Server issue, p. W429-434.
- Huang, S. 2002. «Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus?». *J Cell Biol*, vol. 157, no 5, p. 739-741.
- Huang, Z. P., H. Zhou, H. L. He, C. L. Chen, D. Liang et L. H. Qu. 2005. «Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs». *RNA*, vol. 11, no 8, p. 1303-1316.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman et E. K. O'Shea. 2003. «Global analysis of protein localization in budding yeast». *Nature*, vol. 425, no 6959, p. 686-691.

- Jiang, W., K. Middleton, H. J. Yoon, C. Fouquet et J. Carbon. 1993. «An essential yeast protein, CBF5p, binds *in vitro* to centromeres and microtubules». *Mol Cell Biol*, vol. 13, no 8, p. 4884-4893.
- Jin, D. J., C. Cagliero et Y. N. Zhou. 2012. «Growth rate regulation in *Escherichia coli*». *FEMS microbiology reviews*, vol. 36, no 2, p. 269-287.
- Kishore, S., A. Khanna, Z. Zhang, J. Hui, P. J. Balwierz, M. Stefan, C. Beach, R. D. Nicholls, M. Zavolan et S. Stamm. 2010. «The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing». *Human molecular genetics*, vol. 19, no 7, p. 1153-1164.
- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, J. P. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer et T. Kiss. 1996. «Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs». *Cell*, vol. 85, no 7, p. 1077-1088.
- Klein, D. J., T. M. Schmeing, P. B. Moore et T. A. Steitz. 2001. «The kink-turn: a new RNA secondary structure motif». *EMBO J*, vol. 20, no 15, p. 4214-4221.
- Klinge, S., F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus et N. Ban. 2011. «Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6». *Science*, vol. 334, no 6058, p. 941-948.
- Klump, S., et T. Hwa. 2009. «Traffic patrol in the transcription of ribosomal RNA». *RNA Biol*, vol. 6, no 4, p. 392-394.
- Komili, S., N. G. Farny, F. P. Roth et P. A. Silver. 2007. «Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression». *Cell*, vol. 131, no 3, p. 557-571.
- Kos, M., et D. Tollervay. 2010. «Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally». *Mol Cell*, vol. 37, no 6, p. 809-820.
- Kressler, D., J. de la Cruz, M. Rojo et P. Linder. 1997. «Fal1p is an essential DEAD-box protein involved in 40S-ribosomal-subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol*, vol. 17, no 12, p. 7283-7294.
- Kressler, D., E. Hurt et J. Bassler. 2010. «Driving ribosome assembly». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1803, no 6, p. 673-683.
- Kressler, D., P. Linder et J. de La Cruz. 1999. «Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol*, vol. 19, no 12, p. 7897-7912.

- Krogan, N. J., G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A. P. Tikuisis, T. Punna, J. M. Peregrin-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M. D. Robinson, A. Paccanaro, J. E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D. P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M. M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S. R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J. J. Rilstone, K. Gandi, N. J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M. H. Lam, G. Butland, A. M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'Shea, J. S. Weissman, C. J. Ingles, T. R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S. J. Wodak, A. Emili et J. F. Greenblatt. 2006. «Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *Nature*, vol. 440, no 7084, p. 637-643.
- Krogan, N. J., W. T. Peng, G. Cagney, M. D. Robinson, R. Haw, G. Zhong, X. Guo, X. Zhang, V. Canadien, D. P. Richards, B. K. Beattie, A. Lalev, W. Zhang, A. P. Davierwala, S. Mnaimneh, A. Starostine, A. P. Tikuisis, J. Grigull, N. Datta, J. E. Bray, T. R. Hughes, A. Emili et J. F. Greenblatt. 2004. «High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes». *Mol Cell*, vol. 13, no 2, p. 225-239.
- Lafontaine, D. L., C. Bousquet-Antonelli, Y. Henry, M. Caizergues-Ferrer et D. Tollervey. 1998. «The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase». *Genes Dev*, vol. 12, no 4, p. 527-537.
- Lam, Y. W., A. I. Lamond, M. Mann et J. S. Andersen. 2007. «Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins». *Curr Biol*, vol. 17, no 9, p. 749-760.
- Leer, R. J., M. M. Van Raamsdonk-Duin, W. H. Mager et R. J. Planta. 1985. «Conserved sequences upstream of yeast ribosomal protein genes». *Current genetics*, vol. 9, no 4, p. 273-277.
- Léger-Silvestre, I., J. M. Caffrey, R. Dawaliby, D. A. Alvarez-Arias, N. Gas, S. J. Bertolone, P. E. Gleizes et S. R. Ellis. 2005. «Specific role for yeast homologs of the Diamond Blackfan anemia-associated Rps19 protein in ribosome synthesis». *J Biol Chem*, vol. 280, no 46, p. 38177-38185.
- Léger-Silvestre, I., P. Milkereit, S. Ferreira-Cerca, C. Saveanu, J. C. Rousselle, V. Choesmel, C. Guinefoleau, N. Gas et P. E. Gleizes. 2004. «The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast». *EMBO J*, vol. 23, no 12, p. 2336-2347.

- Léger-Silvestre, I., S. Trumtel, J. Noaillac-Depeyre et N. Gas. 1999. «Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*». *Chromosoma*, vol. 108, no 2, p. 103-113.
- Lemay, V., A. Hossain, Y. N. Osheim, A. L. Beyer et F. Dragon. 2011. «Identification of novel proteins associated with yeast snR30 small nucleolar RNA». *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no 22, p. 9659-9670.
- Leulliot, N., K. S. Godin, C. Hoareau-Aveilla, S. Quevillon-Cheruel, G. Varani, Y. Henry et H. Van Tilbeurgh. 2007. «The box H/ACA RNP assembly factor Naf1p contains a domain homologous to Gar1p mediating its interaction with Cbf5p». *J Mol Biol*, vol. 371, no 5, p. 1338-1353.
- Li, L., et K. Ye. 2006. «Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle». *Nature*, vol. 443, no 7109, p. 302-307.
- Li, S., J. Duan, D. Li, S. Ma et K. Ye. 2011a. «Structure of the Shq1-Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications for H/ACA RNP biogenesis and dyskeratosis congenita». *EMBO J*, vol. 30, no 24, p. 5010-5020.
- Li, S., J. Duan, D. Li, B. Yang, M. Dong et K. Ye. 2011b. «Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase». *Genes Dev*, vol. 25, no 22, p. 2409-2421.
- Liang, B., et H. Li. 2011. «Structures of ribonucleoprotein particle modification enzymes». *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 44, no 1, p. 95-122.
- Liang, X. H., et M. J. Fournier. 2006. «The helicase Has1p is required for snoRNA release from pre-rRNA». *Mol Cell Biol*, vol. 26, no 20, p. 7437-7450.
- Liang, X. H., Q. Liu et M. J. Fournier. 2007. «rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity». *Mol Cell*, vol. 28, no 6, p. 965-977.
- , 2009. «Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing». *RNA*, vol. 15, no 9, p. 1716-1728.
- Lin, J., S. Lai, R. Jia, A. Xu, L. Zhang, J. Lu et K. Ye. 2011. «Structural basis for site-specific ribose methylation by box C/D RNA protein complexes». *Nature*, vol. 469, no 7331, p. 559-563.

- Liu, B., X. H. Liang, D. Piekna-Przybylska, Q. Liu et M. J. Fournier. 2008. «Mis-targeted methylation in rRNA can severely impair ribosome synthesis and activity». *RNA Biol*, vol. 5, no 4, p. 249-254.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen et J. R. Pringle. 1998. «Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*». *Yeast*, vol. 14, no 10, p. 953-961.
- Lübben, B., P. Fabrizio, B. Kastner et R. Lührmann. 1995. «Isolation and characterization of the small nucleolar ribonucleoprotein particle snR30 from *Saccharomyces cerevisiae*». *J Biol Chem*, vol. 270, no 19, p. 11549-11554.
- Lygerou, Z., C. Allmang, D. Tollervey et B. Seraphin. 1996. «Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro». *Science*, vol. 272, no 5259, p. 268-270.
- MacCallum, D. E., et P. A. Hall. 2000. «The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle». *J Pathol*, vol. 190, no 5, p. 537-544.
- Maden, B. E., et J. M. Hughes. 1997. «Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem». *Chromosoma*, vol. 105, no 7-8, p. 391-400.
- McConkey, E. H., et J. W. Hopkins. 1964. «The Relationship of the Nucleolus to the Synthesis of Ribosomal Rna in Hela Cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 51, p. 1197-1204.
- Meier, U. T., et G. Blobel. 1992. «Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm». *Cell*, vol. 70, no 1, p. 127-138.
- Mekhail, K., J. Seebacher, S. P. Gygi et D. Moazed. 2008. «Role for perinuclear chromosome tethering in maintenance of genome stability». *Nature*, vol. 456, no 7222, p. 667-670.
- Mongelard, F., et P. Bouvet. 2007. «Nucleolin: a multiFACeTed protein». *Trends Cell Biol*, vol. 17, no 2, p. 80-86.
- Montanaro, L., D. Trere et M. Derenzini. 2008. «Nucleolus, ribosomes, and cancer». *Am J Pathol*, vol. 173, no 2, p. 301-310.

- Morrissey, J. P., et D. Tollervey. 1993. «Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis». *Mol Cell Biol*, vol. 13, no 4, p. 2469-2477.
- Mullineux, S. T., et D. L. Lafontaine. 2012. «Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand?». *Biochimie*, vol. 94, no 7, p. 1521-1532.
- Nesterenko, M. V., M. Tilley et S. J. Upton. 1994. «A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels». *J Biochem Biophys Methods*, vol. 28, no 3, p. 239-242.
- Newby, M. I., et N. L. Greenbaum. 2002. «Investigation of Overhauser effects between pseudouridine and water protons in RNA helices». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no 20, p. 12697-12702.
- Ni, J., A. L. Tien et M. J. Fournier. 1997. «Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA». *Cell*, vol. 89, no 4, p. 565-573.
- Niewmierzycka, A., et S. Clarke. 1999. «S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase». *J Biol Chem*, vol. 274, no 2, p. 814-824.
- Nottrott, S., K. Hartmuth, P. Fabrizio, H. Urlaub, I. Vidovic, R. Ficner et R. Luhrmann. 1999. «Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA». *EMBO J*, vol. 18, no 21, p. 6119-6133.
- Ochs, R. L., M. A. Lischwe, W. H. Spohn et H. Busch. 1985. «Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera». *Biol Cell*, vol. 54, no 2, p. 123-133.
- Oeffinger, M., K. E. Wei, R. Rogers, J. A. DeGrasse, B. T. Chait, J. D. Aitchison et M. P. Rout. 2007. «Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes». *Nat Methods*, vol. 4, no 11, p. 951-956.
- Osheim, Y. N., S. L. French, K. M. Keck, E. A. Champion, K. Spasov, F. Dragon, S. J. Baserga et A. L. Beyer. 2004. «Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell*, vol. 16, no 6, p. 943-954.

- Parenteau, J., M. Durand, G. Morin, J. Gagnon, J. F. Lucier, R. J. Wellinger, B. Chabot et S. A. Elela. 2011. «Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes». *Cell*, vol. 147, no 2, p. 320-331.
- Perez-Fernandez, J., P. Martin-Marcos et M. Dosil. 2011. «Elucidation of the assembly events required for the recruitment of Utp20, Imp4 and Bms1 onto nascent pre-ribosomes». *Nucleic Acids Res*, vol. 39, no 18, p. 8105-8121.
- Perry, R. P. 2007. «Balanced production of ribosomal proteins». *Gene*, vol. 401, no 1-2, p. 1-3.
- Phipps, K. R., J. M. Charette et S. J. Baserga. 2011. «The small subunit processome in ribosome biogenesis-progress and prospects». *WIREs RNA*, vol. 2, no 1, p. 1-21.
- Piekna-Przybylska, D., W. A. Decatur et M. J. Fournier. 2007. «New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA». *RNA*, vol. 13, no 3, p. 305-312.
- Piekna-Przybylska, D., P. Przybylski, A. Baudin-Baillieu, J. P. Rousset et M. J. Fournier. 2008. «Ribosome performance is enhanced by a rich cluster of pseudouridines in the A-site finger region of the large subunit». *J Biol Chem*, vol. 283, no 38, p. 26026-26036.
- Planta, R. J., et W. H. Mager. 1998. «The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*». *Yeast*, vol. 14, no 5, p. 471-477.
- Plocik, A. M., et C. Guthrie. 2012. «Diverse forms of RPS9 splicing are part of an evolving autoregulatory circuit». *PLoS genetics*, vol. 8, no 3, p. e1002620.
- Pnueli, L., et Y. Arava. 2007. «Genome-wide polysomal analysis of a yeast strain with mutated ribosomal protein S9». *BMC Genomics*, vol. 8, p. 285.
- Pogacic, V., F. Dragon et W. Filipowicz. 2000. «Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10». *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 23, p. 9028-9040.
- Politz, J. C., I. Polena, I. Trask, D. P. Bazett-Jones et T. Pederson. 2005. «A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin». *Mol Biol Cell*, vol. 16, no 7, p. 3401-3410.

- Pringle, J. R., R. A. Preston, A. E. Adams, T. Stearns, D. G. Drubin, B. K. Haarer et E. W. Jones. 1989. «Fluorescence microscopy methods for yeast». *Methods Cell Biol*, vol. 31, p. 357-435.
- Qu, G., R. W. van Nues, N. J. Watkins et E. S. Maxwell. 2011. «The spatial-functional coupling of box C/D and C'/D' RNPs is an evolutionarily conserved feature of the eukaryotic box C/D snoRNP nucleotide modification complex». *Mol Cell Biol*, vol. 31, no 2, p. 365-374.
- Rabl, J., M. Leibundgut, S. F. Ataide, A. Haag et N. Ban. 2011. «Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1». *Science*, vol. 331, no 6018, p. 730-736.
- Raska, I., P. J. Shaw et D. Cmarko. 2006a. «New insights into nucleolar architecture and activity». *International review of cytology*, vol. 255, p. 177-235.
- , 2006b. «Structure and function of the nucleolus in the spotlight». *Curr Opin Cell Biol*, vol. 18, no 3, p. 325-334.
- Reed, M. L., B. K. Dove, R. M. Jackson, R. Collins, G. Brooks et J. A. Hiscox. 2006. «Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein». *Traffic*, vol. 7, no 7, p. 833-848.
- Reichow, S. L., T. Hamma, A. R. Ferré-D'Amaré et G. Varani. 2007. «The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins». *Nucleic Acids Res*, vol. 35, no 5, p. 1452-1464.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann et B. Séraphin. 1999. «A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration». *Nat Biotechnol*, vol. 17, no 10, p. 1030-1032.
- Rodnina, M. V., et W. Wintermeyer. 2003. «Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism». *Curr Opin Struct Biol*, vol. 13, no 3, p. 334-340.
- Roth, F. P., J. D. Hughes, P. W. Estep et G. M. Church. 1998. «Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation». *Nature biotechnology*, vol. 16, no 10, p. 939-945.
- Samanta, M. P., et S. Liang. 2003. «Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no 22, p. 12579-12583.

- Schafer, T., D. Strauss, E. Petfalski, D. Tollervey et E. Hurt. 2003. «The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes». *EMBO J*, vol. 22, no 6, p. 1370-1380.
- Schilling, V., C. Peifer, M. Buchhaupt, S. Lamberth, A. Lioutikov, B. Rietschel, P. Kotter et K. D. Entian. 2012. «Genetic interactions of yeast NEP1 (EMG1), encoding an essential factor in ribosome biogenesis». *Yeast*, vol. 29, no 5, p. 167-183.
- Schimmang, T., D. Tollervey, H. Kern, R. Frank et E. C. Hurt. 1989. «A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability». *EMBO J*, vol. 8, no 13, p. 4015-4024.
- Schlutzen, F., A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi et A. Yonath. 2000. «Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution». *Cell*, vol. 102, no 5, p. 615-623.
- Schmidt, E. V. 1999. «The role of c-myc in cellular growth control». *Oncogene*, vol. 18, no 19, p. 2988-2996.
- Seizl, M., H. Hartmann, F. Hoeg, F. Kurth, D. E. Martin, J. Soding et P. Cramer. 2011. «A conserved GA element in TATA-less RNA polymerase II promoters». *PLoS One*, vol. 6, no 11, p. e27595.
- Sikorski, R. S., et P. Hieter. 1989. «A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*». *Genetics*, vol. 122, no 1, p. 19-27.
- Srisawat, C., et D. R. Engelke. 2001. «Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins». *RNA*, vol. 7, no 4, p. 632-641.
- Taylor, D. J., B. Devkota, A. D. Huang, M. Topf, E. Narayanan, A. Sali, S. C. Harvey et J. Frank. 2009. «Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome». *Structure*, vol. 17, no 12, p. 1591-1604.
- Tongaonkar, P., S. L. French, M. L. Oakes, L. Vu, D. A. Schneider, A. L. Beyer et M. Nomura. 2005. «Histones are required for transcription of yeast rRNA genes by RNA polymerase I». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no 29, p. 10129-10134.

- Torchet, C., G. Badis, F. Devaux, G. Costanzo, M. Werner et A. Jacquier. 2005. «The complete set of H/ACA snoRNAs that guide rRNA pseudouridylations in *Saccharomyces cerevisiae*». *RNA*, vol. 11, no 6, p. 928-938.
- Trahan, C., et F. Dragon. 2009. «Dyskeratosis congenita mutations in the H/ACA domain of human telomerase RNA affect its assembly into a pre-RNP». *RNA*, vol. 15, no 2, p. 235-243.
- Valentin, G. G. (1836). *Repertorium für Anatomie und Physiologie*. Berlin, Verlag von Veit und Comp. 1: 293 p
- van Nues, R. W., S. Granneman, G. Kudla, K. E. Sloan, M. Chicken, D. Tollervey et N. J. Watkins. 2011. «Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing». *EMBO J*, vol. 30, no 12, p. 2420-2430.
- Venema, J., R. J. Planta et H. A. Raué. 1998. «*In vivo* mutational analysis of ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*». *Methods Mol Biol*, vol. 77, p. 257-270.
- Venema, J., et D. Tollervey. 1999. «Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*». *Annu Rev Genet*, vol. 33, p. 261-311.
- Verheggen, C., J. Mouaikel, M. Thiry, J. M. Blanchard, D. Tollervey, R. Bordonne, D. L. Lafontaine et E. Bertrand. 2001. «Box C/D small nucleolar RNA trafficking involves small nucleolar RNP proteins, nucleolar factors and a novel nuclear domain». *EMBO J*, vol. 20, no 19, p. 5480-5490.
- Vilardell, J., et J. R. Warner. 1997. «Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* influences both the splicing of its own transcript and the processing of rRNA». *Mol Cell Biol*, vol. 17, no 4, p. 1959-1965.
- Wang, C., et U. T. Meier. 2004. «Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins». *EMBO J*, vol. 23, no 8, p. 1857-1867.
- Wang, K., W. H. Schmied et J. W. Chin. 2012. «Reprogramming the genetic code: from triplet to quadruplet codes». *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 51, no 10, p. 2288-2297.
- Wang, L., X. M. Ren, J. J. Xing et A. C. Zheng. 2010. «The nucleolus and viral infection». *Virologica Sinica*, vol. 25, no 3, p. 151-157.

- Warner, J. R. 1999. «The economics of ribosome biosynthesis in yeast». *Trends Biochem Sci*, vol. 24, no 11, p. 437-440.
- Warner, J. R., et K. B. McIntosh. 2009. «How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins?». *Mol Cell*, vol. 34, no 1, p. 3-11.
- Watkins, N. J., et M. T. Bohnsack. 2011. «The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA». *WIREs RNA*.
- Watkins, N. J., A. Gottschalk, G. Neubauer, B. Kastner, P. Fabrizio, M. Mann et R. Lührmann. 1998. «Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure». *RNA*, vol. 4, no 12, p. 1549-1568.
- Watkins, N. J., V. Segault, B. Charpentier, S. Nottrott, P. Fabrizio, A. Bachi, M. Wilm, M. Rosbash, C. Branlant et R. Lührmann. 2000. «A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP». *Cell*, vol. 103, no 3, p. 457-466.
- Wool, I. G. 1996. «Extraribosomal functions of ribosomal proteins». *Trends Biochem Sci*, vol. 21, no 5, p. 164-165.
- Wurm, J. P., B. Meyer, U. Bahr, M. Held, O. Frolow, P. Kotter, J. W. Engels, A. Heckel, M. Karas, K. D. Entian et J. Wohnert. 2010. «The ribosome assembly factor Nep1 responsible for Bowen-Conradi syndrome is a pseudouridine-N1-specific methyltransferase». *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no 7, p. 2387-2398.
- Yang, J. M., S. J. Baserga, S. J. Turley et K. M. Pollard. 2001. «Fibrillarin and other snoRNP proteins are targets of autoantibodies in xenobiotic-induced autoimmunity». *Clin Immunol*, vol. 101, no 1, p. 38-50.
- Yang, P. K., C. Hoareau, C. Froment, B. Monsarrat, Y. Henry et G. Chanfreau. 2005. «Cotranscriptional recruitment of the pseudouridyl synthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly». *Mol Cell Biol*, vol. 25, no 8, p. 3295-3304.
- Zhao, J., L. Hyman et C. Moore. 1999. «Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis». *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, vol. 63, no 2, p. 405-445.